

**Verteilung und hormonelle Regulation der  
3': 5'-AMP-Phosphodiesterase in der Leberzelle**

Bernhard M. Schroff

---

1400

---





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Diabetesforschung München

Vorstand: Prof. H. Mehnert

Prof. O. Wieland

Verteilung und hormonelle Regulation der  
3':5'-AMP-Phosphodiesterase in der Leberzelle

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard M. Schroff

aus

Freiburg im Breisgau

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der  
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. D. Hepp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 1980



Herrn Prof. Dr. K. D. Hepp danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für die wertvolle Unterstützung im Verlauf der gesamten Arbeit, die ich unter seiner Leitung im Institut für Diabetesforschung München-Schwabing ausgeführt habe.

Herrn Dr. Renner danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung der Leberperfusion.

Frau R. Anding danke ich für ihre hervorragende technische Hilfe.



Meinen Eltern  
und meiner Frau Helge



| <u>Inhaltsverzeichnis</u>                                                                                    | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <u>1. Einleitung</u>                                                                                         | 1     |
| <u>2. Material und Methodik</u>                                                                              | 3     |
| <u>2.1. Material</u>                                                                                         | 3     |
| 2.1.1. Versuchstiere                                                                                         | 3     |
| 2.1.2. Chemikalien                                                                                           | 3     |
| 2.1.3. Geräte                                                                                                | 5     |
| <u>2.2. Methodik</u>                                                                                         | 6     |
| <u>2.2.1. Präparationen</u>                                                                                  | 6     |
| 2.2.1.1. Präparation von Gesamthomogenat<br>aus Lebergewebe                                                  | 6     |
| 2.2.1.2. Fraktionierung des Leberhomogenates<br>zur subzellulären Lokalisation der<br>PDE-Aktivität          | 6     |
| 2.2.1.3. Präparation des Überstandes aus<br>Leberhomogenat                                                   | 7     |
| 2.2.1.4. Präparation der Leberpartikel-<br>fraktion                                                          | 7     |
| 2.2.1.5. Präparation der Leberschnitten                                                                      | 8     |
| 2.2.1.6. Leberzellpräparation durch Leber-<br>perfusion                                                      | 8     |
| <u>2.2.2. Bestimmung der PDE-Aktivität</u>                                                                   | 12    |
| 2.2.2.1. Testansätze                                                                                         | 12    |
| 2.2.2.2. Auftrennung der Reaktionspro-<br>dukte                                                              | 15    |
| 2.2.2.3. Messung der Enzymaktivität                                                                          | 15    |
| <u>2.2.3. PDE-Aktivität nach Insulingabe in<br/>                                verschiedenen Fraktionen</u> | 15    |
| 2.2.3.1. In vitro-Untersuchungen                                                                             | 15    |
| 2.2.3.2. In vivo-Untersuchungen                                                                              | 16    |
| <u>3. Ergebnisse</u>                                                                                         | 18    |
| <u>3.1. Charakterisierung der PDE</u>                                                                        | 18    |
| 3.1.1. Subzelluläre Verteilung der PDE                                                                       | 18    |
| 3.1.2. Proteinkinetik                                                                                        | 22    |
| 3.1.3. Zeitkinetik                                                                                           | 22    |

|                                                                                                       | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.1.4. Michaelis-Menten-Konstanten                                                                    | 24    |
| 3.1.5. Spezifische Aktivität der PDE                                                                  | 30    |
| <u>3.2. Insulineffekte auf die Aktivität der PDE</u>                                                  | 32    |
| <u>3.2.1. Untersuchungen in vitro</u>                                                                 | 32    |
| 3.2.1.1. Insulineffekt in der Partikel-<br>fraktion (Glukagon + NaF)                                  | 32    |
| 3.2.1.2. Insulineffekt in Leberschnitten                                                              | 33    |
| 3.2.1.3. Insulineffekt an isolierten<br>Leberzellen                                                   | 34    |
| <u>3.2.2. Untersuchungen in vivo</u>                                                                  | 36    |
| 3.2.2.1. Insulineffekt in der Partikel-<br>fraktion nach Infusion von In-<br>sulin in die Vena Portae | 36    |
| 3.2.2.2. Insulineffekt im Überstand und<br>Partikelfraktion diabetischer<br>Mäuse                     | 38    |
| <u>4. Diskussion</u>                                                                                  | 40    |
| <u>5. Zusammenfassung</u>                                                                             | 49    |
| <u>6. Anhang</u>                                                                                      | 50    |
| <u>7. Literaturverzeichnis</u>                                                                        | 55    |
| <u>8. Lebenslauf</u>                                                                                  | 62    |

Verwendete Abkürzungen

|                 |                                                                                |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| cAMP            | zyklisches 3':5'-Adenosinmonophosphat                                          |
| $^3\text{cAMP}$ | $^3\text{H}$ -markiertes radioaktives zyklisches<br>3':5'-Adenosinmonophosphat |
| PDE             | Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1.)                                              |
| SG              | Schlangengift (crotalus atrox terrificus<br>terrificus)                        |
| Ado             | Adenosin                                                                       |
| EDTA            | Äthylendinitrolotetraessigsäure-Di-Na-<br>triumsalz                            |
| Tris            | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                               |
| $K_m$           | Michaelis-Menten-Konstante                                                     |
| Ci              | Curie                                                                          |
| dpm             | desintegrations per minute                                                     |
| cpm             | counts per minute                                                              |
| K               | Kernfraktion                                                                   |
| M               | Mitochondrienfraktion                                                          |
| LM              | leichte Mitochondrienfraktion                                                  |
| Mc              | Microsomenfraktion                                                             |
| S               | Überstand (Supernatent)                                                        |

## IV

|     |                                |
|-----|--------------------------------|
| G   | Gesamthomogenat                |
| ZE  | Zytoplasmatischer Extrakt      |
| P   | Partikelfraktion               |
| KRB | Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung |

## Einleitung:

Obwohl Insulin bei der Behandlung des Diabetes mellitus schon seit mehr als 50 Jahren mit großem Erfolg eingesetzt wird, ist trotz langjähriger Forschung der exakte Wirkungsmechanismus des Insulins an der Zelle nicht hinreichend geklärt. Das Hormon Insulin, das vom endokrinen Teil des Pankreas sezerniert wird, gelangt über den Blutstrom zu seinem Wirkungsort, den Zellmembranen. Die intrazelluläre Konzentration von cAMP, welches von Sutherland und Rall im Jahre 1958 entdeckt worden ist (58) und ein wichtiges Schlüsselenzym im Stoffwechsel der Zelle ist, wird von Insulin reguliert. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß bei diabetischen Ratten der Spiegel an cAMP erhöht ist. Auch gilt als gesichert, daß unter Insulinbehandlung die cAMP-Erhöhung wieder normalisiert wird. Es war ebenfalls Sutherland et al., die das Enzymsystem beschrieben, das die Bildung von cAMP aus ATP katalysierte. Er nannte das System "Adenylatzyklase" (59).

Der cAMP-Spiegel wird durch zwei Systeme gesteuert: die Adenylatzyklase und die Phosphodiesterase. Die Frage, ob die Insulinwirkung auf cAMP über eine Adenylatzyklasehemmung oder über eine Phosphodiesterasestimulation verläuft, wurde unterschiedlich beantwortet. Während Senft et al. 1968 (55) nach Insulinbehandlungen in vivo in der Rattenleber einen deutlichen Effekt sahen, Loten und Sneyd (44) in mit Insulin vorbehandelten Fettzellhomogenaten des Rattennebenhodens ebenfalls einen Anstieg der PDE feststellten und House et al. 1972 (34) sowie Tria et al. 1976 (61) in Plasmamembranen der Rattenleber eine signifikante Insulinstimulierbarkeit der cAMP-PDE beschrieben, sah Müller-Oerlinghausen 1968 (47) keine PDE-Erniedrigung in Leber oder Fettgewebe diabetischer Ratten. Menahan und Hepp (45) konnten 1969 in der perfundierten Rattenleber keine Steigerung der PDE-Aktivität bei Anwesenheit von Insulin in vivo oder in vitro beobachten. Auch an Präparationen aus isolierten Fettzellen sah Hepp 1969 (26) keine direkte Stimulation der PDE.

Ein Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Beschreibung der Phosphodiesterase in der Mäuseleber, insbesondere die subzelluläre Verteilung der Aktivität und der Michaelis-Menten Konstanten in Überstand und Partikelfraktion. Weiterhin sollte analog zum Fettgewebe an der Leber von Mäusen ein möglicher Effekt von Insulin auf die cAMP-Phosphodiesterase gezeigt werden.

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Versuchstiere

Zur Verwendung kamen männliche Schweizer Inzucht-Albinomäuse mit einem Körpergewicht zwischen 30 g und 40 g, sowie männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 150 g bis 250 g. Alle Tiere wurden von der Fa. Gassner, München-Ottobrunn bezogen und erhielten ein Standard-Trockenfutter ("Sniff" Intermast GmbH, Bockum-Hövel) und Wasser ad libitum.

#### 2.1.2. Chemikalien und Geräte

##### 2.1.2.1. Chemikalien

|                        |                                                                                                          |          |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| cAMP:                  | 3':5'-Adenosinmonophosphat                                                                               |          |
| ( <sup>3</sup> H)cAMP: | (8 <sup>3</sup> H) Adenosin 3':5'-cyclic phosphate<br>von The Radiochemical Centre, Amersham,<br>England |          |
| Schlangengift:         | Crotalus atrox terrifikus terrifikus<br>0,5 mg/ml                                                        |          |
| Adenosin:              | Fa. Boehringer, Mannheim (13,4 g/10 ml)                                                                  | } pH 4,6 |
| EDTA:                  | Äthylendinitrolotetraessigsäure-Di-<br>Natriumsalz (186 mg/10 ml)                                        |          |
| Dowex:                 | Fa. Serva, Heidelberg<br>(50 W-X8 100-200 mesh)                                                          |          |
| Bicarbonat:            | NaHCO <sub>3</sub> (2,112 g / 100 ml Aqua bidest.)                                                       |          |
| Sucrose:               | 0,25 M Lösung, pH 7,3                                                                                    |          |
| Tris-Puffer:           | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                                                         |          |

|                            |                                                                                                                                                     |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Szintillations-<br>lösung: | Bray'sche Lösung<br>7 g PPO }<br>0,3 g POPOP } Fa. Merck, Darmstadt<br>20 ml Äthylenglykoll<br>100 g Naphthalin<br>100 ml Äthanol ad 1000 ml Dioxan |
| Glucagon:                  | Synthetisches Glucagon, Präparat von<br>Prof. E. Wünsch, Max-Planck-Institut<br>für Eiweiß- und Lederforschung, München                             |
| Insulin:                   | Krist, Depot-Rinderinsulin der<br>Fa. Hoechst (in vitro Versuche)<br>Alt-Insulin Hoechst Klar CR (zur Injek-<br>tion in vivo)                       |
| Kollagenase:               | Worthington Biochemical Corporation<br>Collagenase CLS II 43 N 114                                                                                  |
| Nembutal:                  | Pentobarbital-Natrium, Fa. Abbott<br>50 mg/kg KG                                                                                                    |
| Streptocotocin:            | Fa. Upjohn, Heppenheim                                                                                                                              |

| Krebs-Ringer Lös.:                          | Substanz                                | Teile<br>ml | Gewicht | H <sub>2</sub> O |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|---------|------------------|
| ("Waschpuffer",<br>calciumfrei)             | NaCl                                    | 103         | 18,0 g  | 1000 ml          |
|                                             | KCl                                     | 4           | 11,5 g  | 500 ml           |
|                                             | (CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O) | 3           | 16,16 g | 500 ml           |
|                                             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 1           | 10,57 g | 250 ml           |
|                                             | MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O   | 1           | 19,1 g  | 250 ml           |
|                                             | NaHCO <sub>3</sub>                      | 21          | 2,6 g   | 100 ml           |
| 130 ml                                      |                                         |             |         |                  |
| + 130 ml H <sub>2</sub> O, da doppelt konz. |                                         |             |         |                  |
| 260 ml + 26 mg Streptomycin                 |                                         |             |         |                  |
| + 1,5 % Gelatine                            |                                         |             |         |                  |

Perfusionspuffer: wie Waschpuffer, aber mit 80 ml statt 103 ml NaCl und mit:

| Substanz        | Teile | Molarität |
|-----------------|-------|-----------|
| Na-Pyruvat      | 4     | 0,16 M    |
| Na-Fumarat      | 7     | 0,1 M     |
| N-L-Glutamat    | 4     | 0,16 M    |
| Glucose (5,4 %) | 5     | 0,3 M     |
| Streptomycin    |       | 36 mg     |

### 2.1.3. Geräte

Homogenisatoren: Ultratourrax (Fa. Janke und Kunkel, Staufen)

Ultraschallhomogenisator Sonic 125  
Fa. Braun

Potter und Elvehjem, Glas-Teflon-  
Homogenisator, A. H. Thomas Co,  
Philadelphia

pH-Meter: Fa. Püsl, München

Photometer: Fa. Eppendorf, Hamburg

Szintillationszähler: Mark II Liquid-Szintillation System  
Searle Comp. USA

Zentrifugen: Sorvall RC 2-B  
Spinco Titan 50, Fa. Beckman, Genf,  
Schweiz  
Eppendorf Tischzentrifuge, Hamburg

Computer: Olivetti, Mod. Programma 1001

## 2.2. Methodik

### 2.2.1. Präparationen

#### 2.2.1.1. Präparation von Gesamthomogenat aus Lebergewebe

Mäuselebern wurden 1:10 mit 0,02 M Tris-Puffer (pH 7,4) aufgenommen, mit der Schere zerkleinert und im Ultratourrax dreimal 10 Sekunden bei Maximalgeschwindigkeit homogenisiert. Die so erhaltene Probe wurde mit Gesamthomogenat bezeichnet.

#### 2.2.1.2. Fraktionierung des Leberhomogenates zur subzellulären Lokalisation der PDE Aktivität

Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 35g und 40g wurden decapitiert, die Lebern sofort entfernt und in 4° C kalter 0,25 M Sucroslösung aufgefangen. Es wurden jeweils 5g Leber mit 15 ml Sucroslösung bei pH 7,3 in einen Glas-Teflon-Homogenisator gegeben. Bei einer Drehzahl von 100 Upm wurde eine einmalige Auf- und Abbewegung gemacht. Das Homogenat wurde 10 Minuten in der Sorvall-Zentrifuge bei 600 x g zentrifugiert, der Niederschlag dreimal mit jeweils 10 ml Sucroslösung wie oben beschrieben rehomogenisiert. Das Sediment aus der letzten Zentrifugation entsprach der Kernfraktion (K). Die Überstände wurden zusammengegossen und galten als zytoplasmatischer Extrakt (ZE). Von ihm wurde für die abschließende Bilanz 1,5 ml bei -18° C aufbewahrt.

Der zytoplasmatische Extrakt wurde 10 Minuten bei 5081 x g in einer Spinco-Zentrifuge mit einem Rotor Ti 50 zentrifugiert. Da die Menge des Extraktes das Fassungsvermögen der Zentrifugenröhrchen des Rotors überstieg, mußte mehrmals hintereinander zentrifugiert werden. Der Niederschlag wurde in 4 ml Sucrose-Lösung mittels eines Plümper resuspendiert und ein weiteres Mal 10 Minuten bei 5081 x g zentrifugiert. Dieses Sediment entsprach der Mitochondrienfraktion (M).

Die Überstände aus den beiden letzten Arbeitsgängen wurden vereinigt und 20 Minuten bei  $18\,992 \times g$  zentrifugiert. Dieser Niederschlag entsprach der leichten Mitochondrienfraktion (L). Der Überstand der L-Fraktion wurde 30 Minuten bei  $183\,000 \times g$  ultrazentrifugiert. Das Sediment enthielt die Microsomenfraktion (Mc). Der Überstand aus diesem Arbeitsgang wurde als eigene Fraktion behandelt und mit Supernatant (S) bezeichnet.

Alle Fraktionen außer (S) wurden danach in  $0,02 \text{ M}$  Tris-Puffer pH 7,4 rehomogenisiert und nochmals 10 Minuten bei  $183\,000 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde die Kernfraktion (K) in 12 ml, die Mitochondrienfraktion (M) und die Fraktion der leichten Mitochondrien (L) in je 5 ml und die Microsomenfraktion (Mc) in 3 ml Tris-Puffer wie oben im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Der Überstand und der zytoplasmatische Extrakt wurden unverdünnt im Test eingesetzt.

#### 2.2.1.3. Präparation des Überstandes aus Leberhomogenat

Gesamthomogenat aus Mäuselebern, das wie unter 2.2.1.1. beschrieben präpariert wurde, diente auch zur Gewinnung von Überstand. Vom Homogenat jeder Leber wurden 2 ml abgezweigt und bei  $-20^{\circ} \text{C}$  aufbewahrt, bis die Präparation des Überstandes beendet war. Dieser wurde durch Zentrifugieren des Homogenates bei  $4^{\circ} \text{C}$  und  $100\,000 \times g$  über 30 Minuten in einer Spinco-Beckman-Kühlzentrifuge gewonnen, die mit einem Rotor SW 50 bestückt war.

#### 2.2.1.4. Präparation der Leberpartikelfraktion

Ca. 2g frische Leber einer Maus wurde in  $0,2 \text{ M}$  Tris-Puffer pH 7,4 aufgenommen und mit der Schere zerkleinert. Daraufhin wurden die Leberstückchen dreimal je 10 Sekunden in einem Ultratourrax bei Maximalgeschwindigkeit homogenisiert und danach in einer Sorvall-Kühlzentrifuge bei  $4^{\circ} \text{C}$  mit  $40\,108 \times g$  20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 18 ml Tris-Puffer ( $0,2 \text{ M}$  pH 7,4) aufgenommen. Nach einer erneuten 20-minütigen Sedimentation bei  $40\,108 \times g$  wurde der Niederschlag in  $0,02 \text{ M}$  Tris-Puffer im Verhältnis

1:4 aufgenommen, nachdem der Überstand verworfen worden war. Die Suspension (ca. 8 ml) wurde nun dreimal in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert, der in Eis eingebettet war. Für die folgenden Tests zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der PDE in der Leberpartikelfraktion wurden je 50  $\mu$ l des Homogenates eingesetzt.

#### 2.2.1.5. Präparation der Leberschnitten

Die Leber einer mit Nembutal narkotisierten Maus wurde in Krebs-Ringer-Lösung gelegt. Das Nembutal wurde in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Auf eine umgedrehte Petrischale wurde Filterpapier gelegt, das ebenfalls mit Krebs-Ringer-Lösung getränkt war. Die Leber wurde mit einem flach aufgesetzten Objektträger auf dem Filterpapier festgehalten. Entlang einer Längskante des Objektträgers wurden mit einer Rasierklinge möglichst hauchdünne Scheibchen abgeschnitten und je 200 mg Leber in 2 ml Krebs-Ringer-Albumin-Lösung aufgefangen (1 g Albumin/100 ml Lösung). Zu einem Teil der Proben wurden verschiedene Mengen von Alt-Insulin Hoechst gegeben. Die Proben wurden 15 Minuten bei 37°C mit Sauerstoff begast. Danach wurde die Lösung abgegossen und den Leberschnitten soviel 0,02 M Tris-Puffer zugegeben, bis das Gesamtvolumen 4 ml betrug, was einer Verdünnung von 1:20 entsprach. Diese Probe wurde mit einem Potter dreimal homogenisiert. Zum Einsatz im Test kamen je 50  $\mu$ l des Gesamthomogenates.

#### 2.2.1.6. Leberzellpräparation durch Leberperfusion

Ratten wurden in Nembutalnarkose auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert und das Abdomen breit eröffnet. Die Eingeweide wurden mit einigen Tropfen Heparin benetzt, um ein Verkleben der Organe und Gefäße zu vermeiden. Danach wurden um die Vena portae zwei Ligaturen, um den Ductus choledochus, die Vena lienalis und die infrahepatische Vena cava inferior jeweils eine Ligatur gelegt, welche noch nicht zugezogen wurde. Der Ductus choledochus und die Vena portae wurden katheterisiert und die zugehörigen Ligaturen angezogen. Die

Katheter wurden selbst hergestellt, indem dünne Plastikschläuche über einer Flamme fein ausgezogen wurden, so daß sich die Spitzen auf einen Durchmesser von 0,5 mm verjüngten. Die Spitzen wurden mit einer Rasierklinge angeschrägt. Jetzt wurde der Perfusionspuffer ( $\text{Ca}^{++}$ -frei) mit ca. 20 ml pro Minute in die Pfortader infundiert. Der Puffer war auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt und stand 50 cm über dem Organniveau. Darauf wurden die Ligaturen der Vena cava inferior und der Vena lienalis festgezogen und die Vena cava inferior distal der Ligatur durchtrennt. Der Thorax wurde von der unteren Apertur her beidseitig in der Axillarlinie aufgeschnitten und abgehoben. Die Vena cava wurde direkt vor dem rechten Vorhof abgetrennt, katheterisiert und der Katheter mit einer Ligatur fixiert. Über dieses Gefäß mußte nun das Medium aus dem Leberpräparat austreten. Der Galleabfluß war über den im Ductus choledochus liegenden Katheter ermöglicht.

Für den weiteren Versuchsablauf stand ein geschlossenes Perfusionssystem zur Verfügung: eine Pumpe ließ ca. 250 ml Perfusionspuffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  zirkulieren. Dabei lief das Medium an der Innenwand eines senkrecht stehenden 50 cm hohen und 6 cm breiten Glaszylinders herab, in welchem es von einem 95%-igem  $\text{O}_2$ - und 5%-igem  $\text{CO}_2$ -Gemisch mit einem Flow von 2 - 3 l/min begast wurde.

Jetzt wurde die Leber herausgenommen und so auf einer perforierten Glasplatte gelagert, daß das Medium aus der Vena cava in einen darunterliegenden Glasbehälter tropfen konnte, der auch mit dem oben beschriebenen  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ -Gemisch begast wurde. Um ein luftdichtes System zu erhalten, wurde auf die perforierte Glasplatte eine Glashaube gesetzt, die nur dem zuführenden Perfusionsschlauch und dem ableitenden Gallekatheter Zugang ließ. Darauf wurde die Leber in das oben beschriebene geschlossene Perfusionssystem integriert. Jetzt wurde der begaste Puffer über die Pfortader durch die Leber gepumpt und das abtropfende Medium unter der Leber floß zu dem Begasungszylinder zurück.

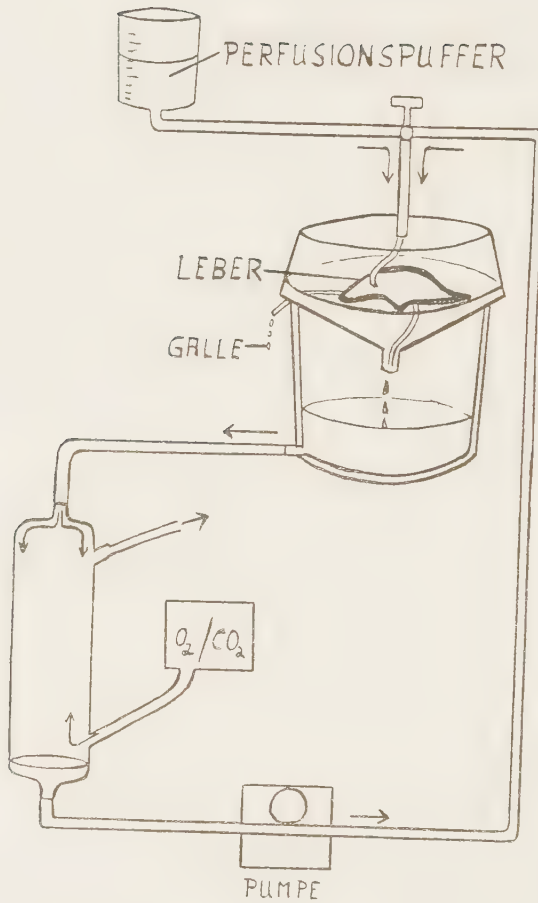


Abb. 1: Versuchsanordnung der Leberperfusion zur Gewinnung von isolierten Leberzellen

Nach 15 Minuten Perfusion mit 30 ml/min wurden 30 mg Kollagenase in 2 ml 0,9%-igem NaCl dem System zugegeben und erneut perfundiert. Dabei wurde die Leistung der Pumpe auf 100 ml/min erhöht, bis die Leber nach 15 Minuten extrem geschwollen war. Nun wurde die Leber aus dem System genommen, von Gefäßen und sichtbarem Bindegewebe befreit und in 20 ml Waschpuffer ( $\text{Ca}^{++}$ -frei und 1,5% Gelatine) mit der Schere zerkleinert. Das Filtern durch Gaze ergab etwa 40 ml Suspension. Diese wurde viermal mit je 30 ml Waschpuffer bei 50 x g für 75 - 90 Sekunden gewaschen. Danach wurden die Zellen in 30 ml des gleichen Waschpuffers aufgenommen, welcher mit 2 g % Albumin angereichert war. Die Zellzahl lag im Durchschnitt bei  $6,5 \times 10^6$  Zellen/ml, was etwa 70% des Lebergewichtes entsprach. Im Mikroskop waren mehr als 90% der Zellen morphologisch als intakt anzusehen. Über 95% zeigten keine Anfärbung des Zytoplasmas mit Trypan-Blau, was für eine intakte Zellmembran sprach.

Einem Milliliter der Zellsuspension wurde 0,1 ml Insulinlösung zugegeben, den Kontrollen stattdessen 0,1 ml Krebs-Ringer-Lösung (pH 7,2 + 2 g% Albumin, glucosefrei). Das Volumen wurde mit 0,1 ml Bicarbonat und 0,05 ml 0,02 M Tris-Puffer bis auf 1,25 ml aufgefüllt. Die Proben wurden 15 Minuten unter Schütteln im Wasserbad bei 37° C inkubiert und darauf mit je 1,25 ml Tris-Puffer von 0° C versetzt. Nach dreimaligem Homogenisieren von je 10 Sekunden Dauer im Ultratourrax wurden sie 15 Minuten in der Sorvall Zentrifuge bei 40 000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und 5 Sekunden ultrabeschallt. Proben aus Pellet und Überstand wurden mit je 50 µl im Test eingesetzt.

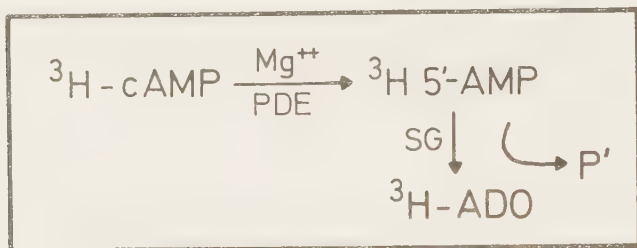
Zur Vitalitätsprüfung der isolierten Leberzellen wurde die Bildung von Glucose durch die Glykogenolyse gemessen.

0,1 ml Glucagon wurde in steigender Konzentration von 0,04 g, 0,2 g, 1,0 g und 5 g/ml einem Milliliter Zellsuspension neben 0,1 ml Bicarbonat (2,112 g / 100 ml) und 0,05 ml Krebs-Ringer-Lösung (pH 7,2 + 2 g% Albumin, glucosefrei) zugesetzt. Die Proben wurden 30 Minuten bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Die Glucose wurde nach Filtern der Proben photo-

metrisch gemessen.

### 2.2.2. Bestimmung der Phosphodiesterase-Aktivität

Phosphodiesterase setzt in Gegenwart von Magnesiumionen  $3':5'$ -AMP in  $5'$ AMP um. Im Test wurde Tritium-markiertes cAMP im Überschuß gegeben. Nach der enzymatischen Reaktion wurde mittels Schlangengift  $^3\text{H}$ -Adenosin aus  $^3\text{H}$ - $5'$ AMP gebildet.



Aus diesem Reaktionsgemisch wurde über Ionenaustauschsäulen  $^3\text{H}$ -Adenosin separiert und im Szintillationszähler gemessen.

#### 2.2.2.1. Testansätze

Die Proben Gesamthomogenat und Überstand wurden mit 0,02 M Tris-Puffer 1:20 verdünnt. Die anderen Leberzellfraktionen wurden in den jeweils angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Es wurden stets Doppelwerte bestimmt. In jedem Ansatz waren 60mM Tris-Cl, 3mM  $\text{MgCl}_2$  und 47 nM  $^3\text{H}$ -cAMP enthalten. Die Proben zur Bestimmung der Protein- und Zeitkinetik enthielten je  $1\mu\text{M}$  cAMP. Bei der Berechnung der Michaelis-Menten-Konstanten wurde eine Verdünnungsreihe von cAMP verwendet. In den Versuchen zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Phosphodiesterase wurden  $1\mu\text{M}$  und  $100\mu\text{M}$  cAMP parallel eingesetzt. Die Testvolumina wurden mit Aqua bi-distillata auf  $100\mu\text{l}$  aufgefüllt.

### Proteinkinetik

Bei der Untersuchung der Proteinabhängigkeit im Überstand wurden bei konstanter Substratkonzentration steigende Enzymmengen von 5 - 40  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Im Vergleich dazu wurden 20  $\mu\text{l}$  Gesamthomogenat getestet. Folgende Tabelle zeigt diesen Testansatz:

| Probe              | Überstand |     |     |     |     |     | Ges. Homog. |
|--------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
|                    | 0-Wert    | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | A           |
| Tris-Cl            | 10        | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10          |
| MgCl               | 10        | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10          |
| <sup>3</sup> HcAMP | 10        | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10          |
| cAMP               | 10        | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10          |
| Enzym              | 0         | 5   | 10  | 20  | 30  | 40  | 20          |
| H <sub>2</sub> O   | 60        | 55  | 50  | 40  | 30  | 20  | 40          |
| gesamt             | 100       | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100         |

Tab. 1: Testansatz zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit  
Dem Enzym entsprechen alle Zellfraktionen bzw. Präparationen der Mäuseleber (Mengenangabe in  $\mu\text{l}$ ).

Gestartet wurde der Test mit der Zugabe des Enzyms, die Proben wurden 10 Minuten bei 30° C inkubiert, danach mit 20  $\mu\text{l}$  Schlangengift (Crotal. atrox terr. terr.) versetzt und weitere 10 Minuten bei 30° C inkubiert. Darauf wurde die Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$  EDTA-ADO gestoppt und die Probe in Eis gestellt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O wurde das Reaktionsgemisch quantitativ auf Säulen übertragen.

### Zeitkinetik

Um den Umsatz des Enzyms in Abhängigkeit von der Zeit zu testen, liefen Versuchsreihen mit je 20  $\mu\text{l}$  des Enzyms im 2-Minutenabstand bis maximal 10 Minuten. Es wurde ebenfalls nur im Überstand untersucht. Im Unterschied zur Proteinkinetik wurde die Reaktion mit 3-minütigem Kochen, Ab-

kühlen und anschließender Inkubation mit 20  $\mu$ l Schlangengift gestoppt. Die weitere Behandlung war die gleiche, wie bei der Proteinabhängigkeit beschrieben.

#### Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

Die Michaelis-Menten-Konstanten wurden im Überstand und in der Partikelfraktion ermittelt. Dabei blieb die Enzymmenge mit 50  $\mu$ l konstant, cAMP hingegen wurde in aufsteigender Konzentration von 0,05  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M verwendet, wovon jeweils ein Aliquot von 10  $\mu$ l zum Einsatz kam. Die Behandlung der Proben erfolgte wie bei der Proteinkinetik. Die  $K_m$  wurde sowohl graphisch als auch rechnerisch mit einem Computerprogramm (Fa. Olivetti) ermittelt. Die Umsatzgeschwindigkeit berechnet sich nach der Formel:

$$V = \frac{\text{dpm} \times \text{Molarität}}{\text{dpm}_{\text{Standard}} \times \text{Zeit}} \quad \left[ \text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \right]$$

#### Bestimmung der spezifischen Aktivität der Phosphodiesterase

Auf Grund der Ergebnisse zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten wurden die beiden Konzentrationen 1  $\mu$ M und 100  $\mu$ M in Mengen von jeweils 10  $\mu$ l cAMP verwendet, um die spezifische Aktivität der Phosphodiesterase unter normalen Verhältnissen ohne Stimulation in allen Fraktionen zu ermitteln. Die Behandlung der Proben erfolgte ebenfalls wie bei der Proteinkinetik beschrieben. Die spezifische Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spez. Akt.} = \frac{\text{dpm} \times \text{Molarität}}{\text{dpm}_{\text{Stand.}} \times \text{Zeit} \times \text{Protein/Test}} \quad \left[ \text{nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \right]$$

Bei allen weiteren Versuchen zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurden 1  $\mu$ M und 100  $\mu$ M cAMP eingesetzt.

#### 2.2.2.2. Auftrennung der Reaktionsprodukte

Die Reaktionsprodukte der oben beschriebenen Enzymteste wurden zur Abtrennung des  $^3\text{H}$ -Adenosin über Säulen geschichtet. Als Säulen wurden 0,5 x 15 cm Pasteur-Pipetten mit aufgeschweißtem Reservoir verwendet, die mit einer 1:1 mit  $\text{H}_2\text{O}$  gebildeten Aufschwemmung des Ionenaustauschharzes Dowex beschickt wurden. Als Fritte diente ein kleiner, ausgestanzter Schaumstoffzylinder. Die Höhe der Dowex-Säule betrug nach Absetzen 2,5 cm. Nachdem die so vorbereiteten Pipetten 30 Minuten mit  $\text{H}_2\text{O}$  durchgespült worden waren, wurden die Proben quantitativ auf die Säulen übertragen. Schließlich wurde jede Säule mit je 3,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und das Eluat in Zählgläschen aufgefangen.

#### 2.2.2.3. Messung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität des abgetrennten  $^3\text{H}$ -Adenosin wurde jedes Eluat mit je 17 ml Brayscher Szintillationslösung verdünnt und die Impulse pro Minute in einem Szintillationszähler ermittelt. Da die Zählausbeute des Szintillationszählers ca. 10% betrug und 200 000 dpm im Test erwünscht waren - wovon dann 20 000 dpm tatsächlich gezählt wurden - mußte von vorliegenden 3,6  $\mu\text{g}$   $^3\text{HcAMP}$  (0,25 mCi in 0,5 ml) eine 1:5000 Verdünnung hergestellt werden. Diese Verdünnung entsprach bei  $2,6 \times 10^5$  dpm ungefähr 47 pmol/ml. Hiermit betrug die Endkonzentration in jeder Probe des Testansatzes 47 nM. Als Standard wurden 10  $\mu\text{l}$   $^3\text{HcAMP}$  in 3,71 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 17 ml Szintillationslösung mitgezählt. Bei den 0-Werten wurde die jeweils höchste Konzentration von cAMP im Test eingesetzt.

#### 2.2.3. Phosphodiesterase-Aktivität nach Insulingabe in verschiedenen Fraktionen

##### 2.2.3.1. In vitro-Untersuchungen

Der erste Versuch wurde mit der Partikelfraktion durchgeführt. Dabei wurde im gleichen Testansatz wie zur Bestimmung der Proteinkinetik neben jeweils 10  $\mu\text{l}$  der Partikel-

fraktion 10  $\mu$ l Insulin, Glucagon oder NaF bzw. eine Kombination dieser Substanzen eingesetzt. Es wurden jeweils 5  $\mu$ E Insulin, 50 ng Glucagon und 1 mM NaF pro Testansatz verwendet.

Zu den oben beschriebenen Leberschnitten wurden folgende Insulinkonzentrationen beigegeben: 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000  $\mu$ E/ml. Jeder Probe, welche 200 mg Lebergewebe in 1,9 ml Krebs-Ringer-Albumin-Lösung enthielt, wurden je 0,1 ml der verschiedenen Insulinlösungen zugegeben. Dem Lebergewebe der Kontrollen wurden 2 ml Krebs-Ringer-Albumin-Lösung (Albumin 7,6 g%) zugesetzt.

Bei den isolierten Leberzellen wurden 100  $\mu$ E und 1000  $\mu$ E Insulin eingesetzt. Bei einer zusätzlichen Probe mit 1000  $\mu$ E Insulin wurden 50 mM  $\text{Ca}^{++}$  zugegeben. Dieser Test wurde nur mit 1  $\mu$ M cAMP durchgeführt.

#### 2.2.3.2. In vivo-Untersuchungen

Einer Gruppe von Mäusen wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle in Äthernarkose 500  $\mu$ E Insulin in 1 ml 0,9%-iger NaCl in die Pfortader infundiert. Sofort danach wurden ihre Lebern sowie die einer mit 1 ml Kochsalz infundierten Kontrollgruppe herausgenommen und ihre Gewichte bestimmt. Anschließend wurden die Lebern nach dem Verfahren zur Gewinnung der Partikelfraktion weiterbehandelt. Die Partikelfraktion wurde 1:5 mit 0,02 M Tris-Puffer verdünnt und mit 50  $\mu$ l im Test eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wurden die Lebern von drei Gruppen untersucht:

1. Kontrollgruppe
2. diabetische Mäuse
3. mit Insulin behandelte diabetische Mäuse

Bei der 2. und 3. Gruppe wurde ein Streptozotocin-Diabetes induziert, wobei 200 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert wurden. Das Streptozotocin wurde in 0,9%-igem NaCl, das mit einigen Tropfen Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt war kurz vor der Anwendung gelöst. Die letzte Gruppe wurde am 6. und 8. Tag mit Insulin behandelt. Es wurden je 0,25 ml Depot-Insulin, das 1:20 mit 0,9%-iger NaCl verdünnt war, subcutan

in den Nacken appliziert. Am 9. Tag wurde die Injektion wiederholt und 30 Minuten später alle drei Gruppen mit Nembutal (50 mg/kg KG) betäubt. Nach einer Blutzuckerbestimmung (7) (Hexokinase-Methode) wurden die herausoperierten Lebern von sichtbarem Bindegewebe befreit und der Präparation des Überstandes bzw. der Partikelfraktion zugeführt.

### Statistik

Aus den ermittelten Werten wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) sowie der mittlere Fehler (SEM) berechnet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch den Student-T-Test für unverbundene Stichproben. Statistisch gesicherte Differenzen wurden ab einem  $p$  0,05 angenommen. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurden graphisch und mathematisch durch Bestimmung der linearen Regression mit einem Olivetti-Computer-Programm aus der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der Phosphodiesterase

##### 3.1.1. Subzelluläre Verteilung der Phosphodiesterase

Die Untersuchungen zur Bestimmung der subzellulären Verteilung der Phosphodiesterase bei Zugabe von 0,1 mM cAMP je Probe ergaben, daß 90,5% der Enzymaktivität im Überstand zu finden waren. Die Kernfraktion enthielt 5,6%, die übrigen Fraktionen unter 3%. Bei Einsatz von 1 M cAMP zeigten sich 21,8% der Aktivität in der Kernfraktion, 69,3% im Überstand, 5,9% in der Fraktion der leichten Mitochondrien und in den übrigen Fraktionen Werte unter 2%. Das Verteilungsmuster der Proteinanteile ergab 45% im Überstand, 32% in der Kernfraktion, 10,5% in der Fraktion der leichten Mitochondrien, 8% in der Mitochondrienfraktion und 4% in den Mikrosomen. Die spezifische Aktivität war mit  $3,45 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  im Überstand mehr als zehnmal so hoch wie in der Kernfraktion. Die Tabelle (2) zeigt neben diesen Ergebnissen weitere Parameter der verschiedenen Fraktionen.

#### Legende zu Tabelle (2)

Für die einzelnen Fraktionen sind folgende Werte von links nach rechts angegeben: dpm minus Leerwert, eingesetzte Enzymmenge pro Test, Mengen und Proteingehalt der Fraktionen, umgesetzte Substratmenge, spezifische Aktivität, sowie die absolute und prozentuale Verteilung der Aktivität.

| Fraktion      | dpn=0 Wert | Aliquot<br>μl | Fraktion<br>ml | Eiweiß<br>(Biuret)<br>mg/ml | Protein pro<br>Fraktion mg | % Protein in<br>d. Fraktion | un-gesetzte<br>Substratmenge<br>nmol pro<br>ml Aliquot · min | spez. Aktivität<br>nmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> | nmol · ml Fraktion<br>ml Aliquot · min<br>Aktivität pro Fraktion | · Aktivität in<br>d. Fraktion |
|---------------|------------|---------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>0,1 mM</i> |            |               |                |                             |                            |                             |                                                              |                                                                |                                                                  |                               |
| C.EX          | 128        | 631           | 10             | 35                          | 17,8                       | 622                         | 30,4                                                         | 1,7                                                            | 1060,0                                                           |                               |
| K             | 9          | 704           | 5              | 12                          | 15,2                       | 182                         | 4,55                                                         | 0,3                                                            | 54,7                                                             | 5,65                          |
| M             | 2          | 771           | 5              | 5                           | 9,1                        | 45,6                        | 1,28                                                         | 0,14                                                           | 6,4                                                              | 0,60                          |
| L             | 11         | 306           | 5              | 5                           | 12,0                       | 60                          | 5,32                                                         | 0,445                                                          | 26,6                                                             | 2,75                          |
| Mc            | 4          | 090           | 5              | 3                           | 7,6                        | 22,7                        | 1,94                                                         | 0,255                                                          | 5,82                                                             | 0,6                           |
| S             | 76         | 135           | 10             | 49                          | 5,2                        | 255                         | 17,9                                                         | 3,45                                                           | 875,0                                                            | 90,5                          |
|               |            |               |                |                             |                            | 565,3                       |                                                              | 99,7                                                           | 968,5                                                            | 100,16                        |

G

1 μM

|      |     |     |    |    |      |       |       |        |        |        |
|------|-----|-----|----|----|------|-------|-------|--------|--------|--------|
| C.EX | 142 | 461 | 10 | 35 | 17,8 | 622   | 0,336 | 0,0189 | 11,8   |        |
| K    | 98  | 119 | 5  | 12 | 15,2 | 182   | 0,460 | 0,0303 | 5,53   | 21,8   |
| M    | 13  | 390 | 5  | 5  | 9,1  | 45,6  | 0,063 | 0,0069 | 0,315  | 1,22   |
| L    | 64  | 065 | 5  | 5  | 12,0 | 60    | 0,300 | 0,0250 | 1,50   | 5,9    |
| Mc   | 33  | 457 | 5  | 3  | 7,6  | 22,7  | 0,158 | 0,0207 | 0,473  | 1,86   |
| S    | 152 | 530 | 10 | 49 | 5,2  | 255   | 0,360 | 0,0690 | 17,6   | 69,3   |
|      |     |     |    |    |      | 565,3 |       | 99,7   | 25,418 | 100,08 |

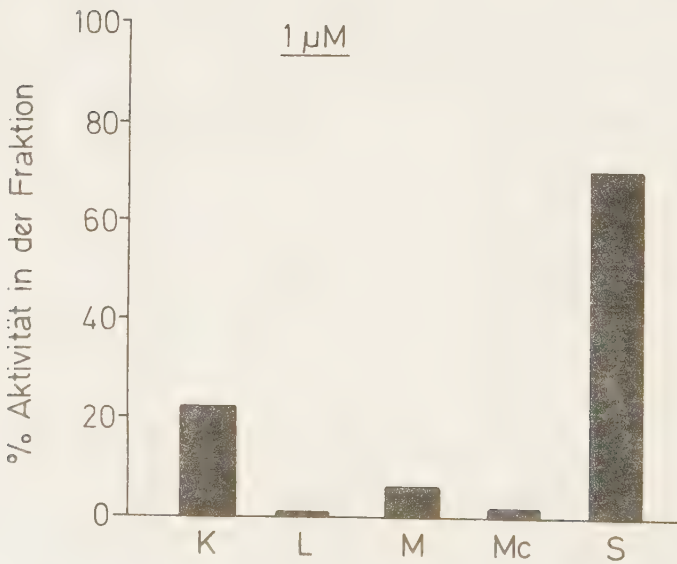
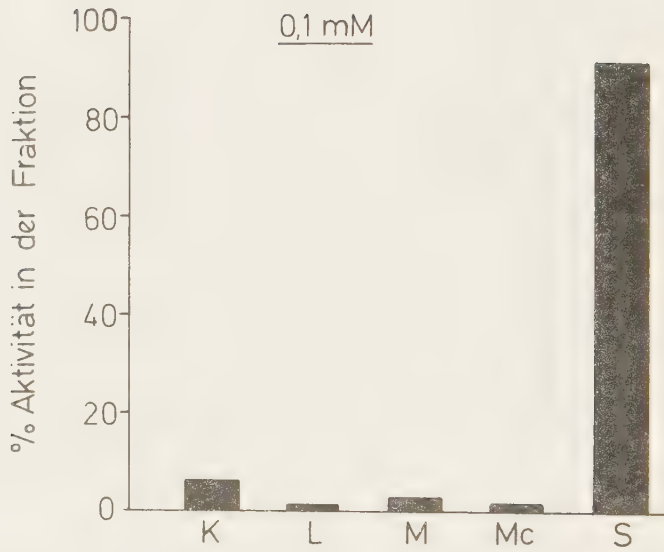


Abb. 2 Aktivität in den Fraktionen in % der Gesamtaktivität

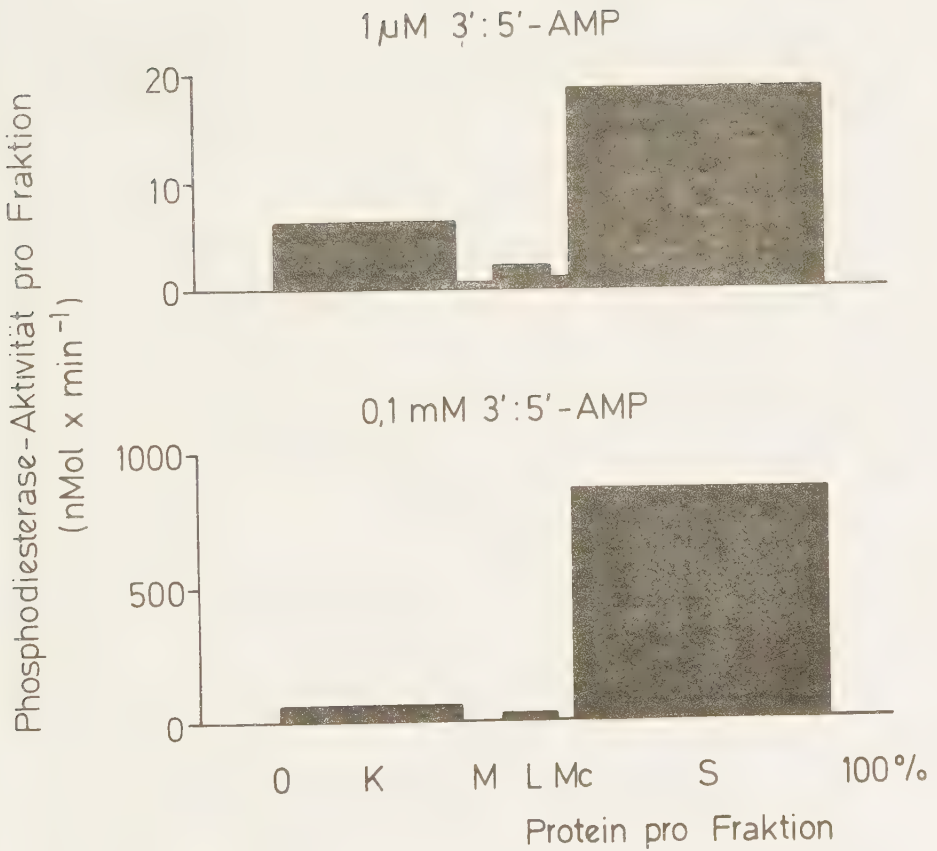


Abb. 3 : Phosphodiesterase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen bei zwei Substratkonzentrationen ( 1  $\mu$ M und 0,1 mM 3':5'-AMP). (Auftrag nach De-Duve)

Abkürzungen: K: Kernfraktion, M: Mitochondrienfr.,  
L: leichte Mitochondrien, Mc: Microsomen, S: Überstand

### 3.1.2. Proteinkinetik

Mit zunehmender Enzymmenge stieg die Aktivität der Phosphodiesterase im Überstand proportional an. In der graphischen Darstellung läßt sich eine lineare Beziehung zwischen Proteinmenge und cpm erkennen.

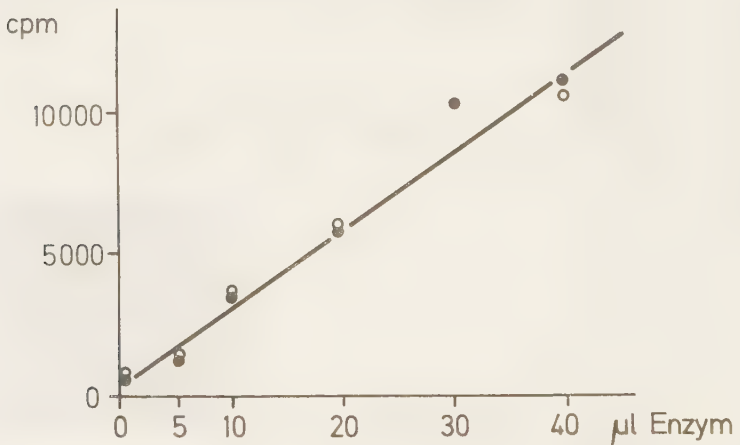


Abb. 4 : Umsatz der Phosphodiesterase bei unterschiedlichen Proteinmengen.

### 3.1.3. Zeitkinetik

Der Substratumsatz stieg mit Verlängerung der Testzeit kontinuierlich an. Dabei ergab sich ebenfalls eine nahezu lineare Abhängigkeit der dpm-Werte von der Zeitdauer.

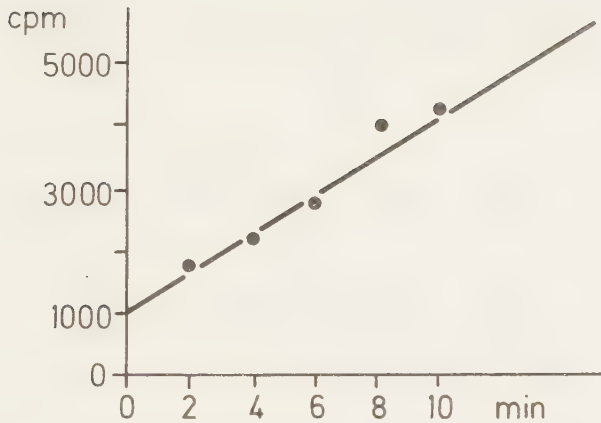


Abb. 5 : In der Abbildung sind die dpm-Werte zu der jeweiligen Testzeit aufgeführt.

| Proteinkinetik   |              | Zeitkinetik  |              |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Enzym<br>$\mu$ l | dpm - O-Wert | Zeit<br>min. | dpm - O-Wert |
| 5                | 10 130       | 2            | 8 094        |
| 10               | 30 859       | 4            | 11 997       |
| 20               | 57 680       | 6            | 20 037       |
| 30               | 102 836      | 8            | 29 221       |
| 40               | 106 034      | 10           | 31 451       |

Tab. 3: Gegenüberstellung der eingesetzten Enzymmengen in bzw. der Zeit und der dpm abzüglich der O-Werte.

cAMP: 1  $\mu$ M

### 3.1.4. Michaelis-Menten-Konstanten

Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten im Überstand im Bereich der Verdünnungsreihe von  $0,05 \mu\text{M}$  -  $10 \mu\text{M}$  cAMP ergaben sich die in folgender Tabelle aufgeführten Werte:

| Molarität<br>$\mu\text{ Mol}$ | V     |   |           | $\frac{1}{V}$ | $\frac{1}{S}$ |
|-------------------------------|-------|---|-----------|---------------|---------------|
| 0,050                         | 1,24  | x | $10^{-9}$ | 0,805         | 20,0          |
| 0,100                         | 2,4   | x | $10^{-9}$ | 0,417         | 10,0          |
| 0,250                         | 6,32  | x | $10^{-9}$ | 0,158         | 4,0           |
| 0,500                         | 12,43 | x | $10^{-9}$ | 0,0805        | 2,0           |
| 0,600                         | 14,94 | x | $10^{-9}$ | 0,067         | 1,66          |
| 0,800                         | 1,98  | x | $10^{-9}$ | 0,505         | 1,25          |
| 1,000                         | 15,7  | x | $10^{-9}$ | 0,0636        | 1,0           |
| 2,000                         | 46,2  | x | $10^{-9}$ | 0,0216        | 0,5           |
| 5,000                         | 113,0 | x | $10^{-9}$ | 0,00885       | 0,2           |
| 10,000                        | 215,0 | x | $10^{-9}$ | 0,00465       | 0,1           |

Tab. (4)

In der Abb. (6) sind deutlich zwei Bereiche im Kurvenverlauf zu erkennen, die sich in ihren Steigungen unterscheiden und deren Schnittpunkt bei  $1 \mu\text{M}$  cAMP liegt. Aus diesem Ergebnis mußte das Vorliegen zweier Michaelis-Menten-Konstanten angenommen werden. Die  $K_m$  im Bereich von  $0,05 - 1 \mu\text{M}$  cAMP liegt bei  $1,66 \mu\text{M}$ , im Bereich von  $1 - 10 \mu\text{M}$  bei  $31 \mu\text{M}$ . In einem weiteren Versuch wurden die beiden Bereiche getrennt untersucht. Es ergaben sich folgende Werte:

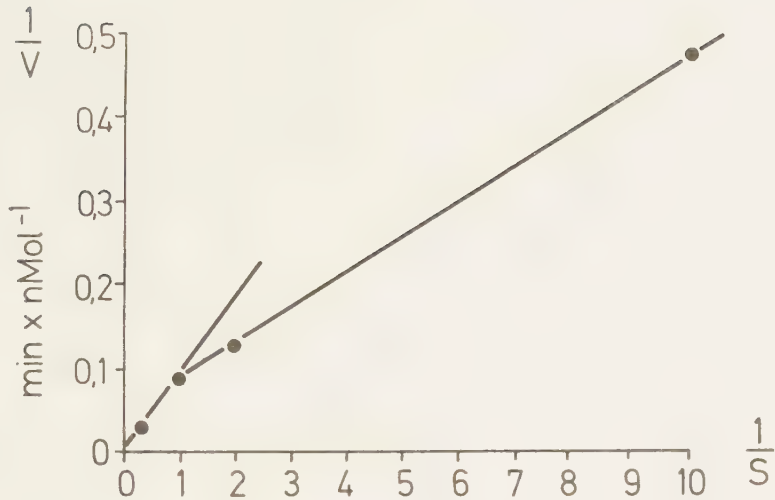


Abb. (6): Die Reziprokwerte der Substratkonzentration und der Umsatzgeschwindigkeit sind im Bereich von 0,05 - 10  $\mu$  M cAMP graphisch dargestellt.

| Molarität<br>$\mu$ Mol | V                      | $\frac{1}{V}$ | $\frac{1}{S}$ |
|------------------------|------------------------|---------------|---------------|
| 0,050                  | $1,53 \times 10^{-9}$  | 0,652         | 20,0          |
| 0,062                  | $1,557 \times 10^{-9}$ | 0,642         | 16,1          |
| 0,100                  | $2,38 \times 10^{-9}$  | 0,42          | 10,0          |
| 0,125                  | $3,38 \times 10^{-9}$  | 0,295         | 8,0           |
| 0,166                  | $3,63 \times 10^{-9}$  | 0,275         | 6,0           |
| 0,250                  | $4,69 \times 10^{-9}$  | 0,213         | 4,0           |
| 0,500                  | $9,8 \times 10^{-9}$   | 0,102         | 2,0           |
| 0,600                  | $10,43 \times 10^{-9}$ | 0,096         | 1,66          |
| 0,800                  | $10,78 \times 10^{-9}$ | 0,093         | 1,25          |
| 1,000                  | $17,18 \times 10^{-9}$ | 0,058         | 1,0           |
| 1,250                  | $9,79 \times 10^{-9}$  | 0,102         | 0,8           |
| 1,500                  | $11,7 \times 10^{-9}$  | 0,085         | 0,665         |
| 2,000                  | $15,4 \times 10^{-9}$  | 0,065         | 0,5           |
| 3,000                  | $19,8 \times 10^{-9}$  | 0,050         | 0,333         |
| 5,000                  | $26,7 \times 10^{-9}$  | 0,037         | 0,2           |
| 10,000                 | $63,2 \times 10^{-9}$  | 0,016         | 0,1           |

Tab. (5)

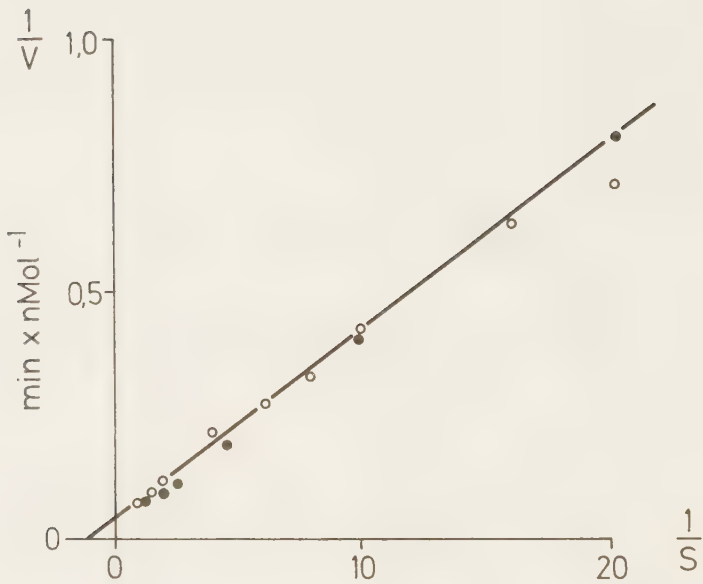


Abb. (7): Es sind die Werte  $\frac{1}{S}$  aus beiden Versuchen im Bereich von  $0,05 - 1 \mu\text{M}$  cAMP gegen  $\frac{1}{v}$  aufgetragen.

(niedere  $K_m$ :  $1,66 \mu\text{M}$  bzw.  $0,72 \mu\text{M}$ )

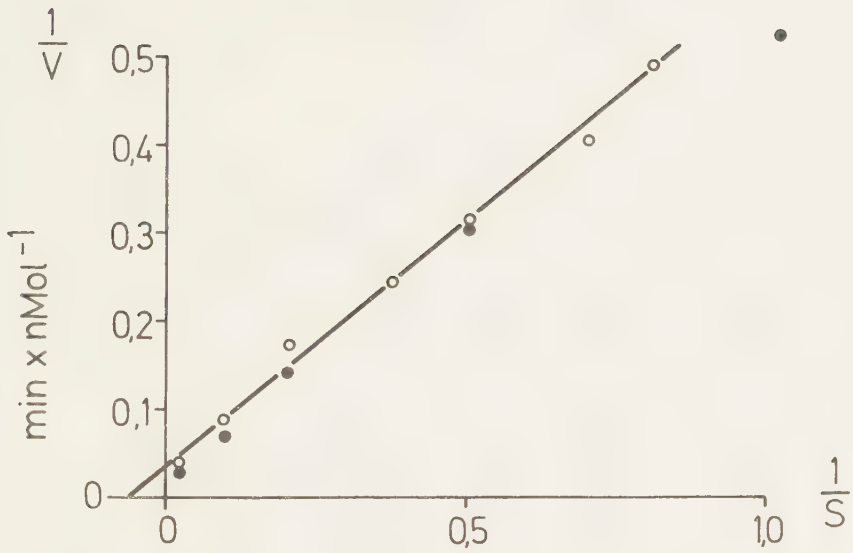


Abb. (8): In der Graphik sind die Werte  $\frac{1}{S}$  aus beiden Versuchen im Bereich von  $1,0 - 10 \mu\text{M}$  cAMP gegen  $\frac{1}{v}$  aufgetragen.

(hohe  $K_m$ :  $31 \mu\text{M}$  bzw.  $40 \mu\text{M}$ )

In der Partikelfraktion wurden ebenfalls die Konzentrationen 50 - 1000 n Mol cAMP und 1 bis 10  $\mu$ M cAMP zur Ermittlung der  $K_m$  verwendet. In der Tabelle (6) sind die Werte des Versuches angegeben.

| Molarität<br>$\mu$ Mol | V                      | $\frac{1}{V}$ | $\frac{1}{S}$ |
|------------------------|------------------------|---------------|---------------|
| 0,050                  | $0,70 \times 10^{-9}$  | 1,43          | 20,0          |
| 0,062                  | $0,86 \times 10^{-9}$  | 1,16          | 16,2          |
| 0,100                  | $1,38 \times 10^{-9}$  | 0,725         | 10,0          |
| 0,125                  | $1,85 \times 10^{-9}$  | 0,542         | 8,0           |
| 0,166                  | $2,27 \times 10^{-9}$  | 0,442         | 6,0           |
| 0,250                  | $3,48 \times 10^{-9}$  | 0,288         | 4,0           |
| 0,500                  | $7,23 \times 10^{-9}$  | 0,138         | 2,0           |
| 0,600                  | $8,35 \times 10^{-9}$  | 0,120         | 1,66          |
| 0,800                  | $11,33 \times 10^{-9}$ | 0,089         | 1,25          |
| 1,000                  | $15,40 \times 10^{-9}$ | 0,065         | 1,0           |
| 1,250                  | $18,7 \times 10^{-9}$  | 0,0535        | 0,8           |
| 1,500                  | $23,2 \times 10^{-9}$  | 0,0432        | 0,6           |
| 2,000                  | $29,8 \times 10^{-9}$  | 0,0336        | 0,5           |
| 3,000                  | $49,5 \times 10^{-9}$  | 0,0202        | 0,3           |
| 5,000                  | $65,1 \times 10^{-9}$  | 0,0154        | 0,2           |
| 10,000                 | $227,0 \times 10^{-9}$ | 0,0044        | 0,1           |
| 50,000                 | $735,0 \times 10^{-9}$ | 0,0014        | 0,02          |

Tab.(6):

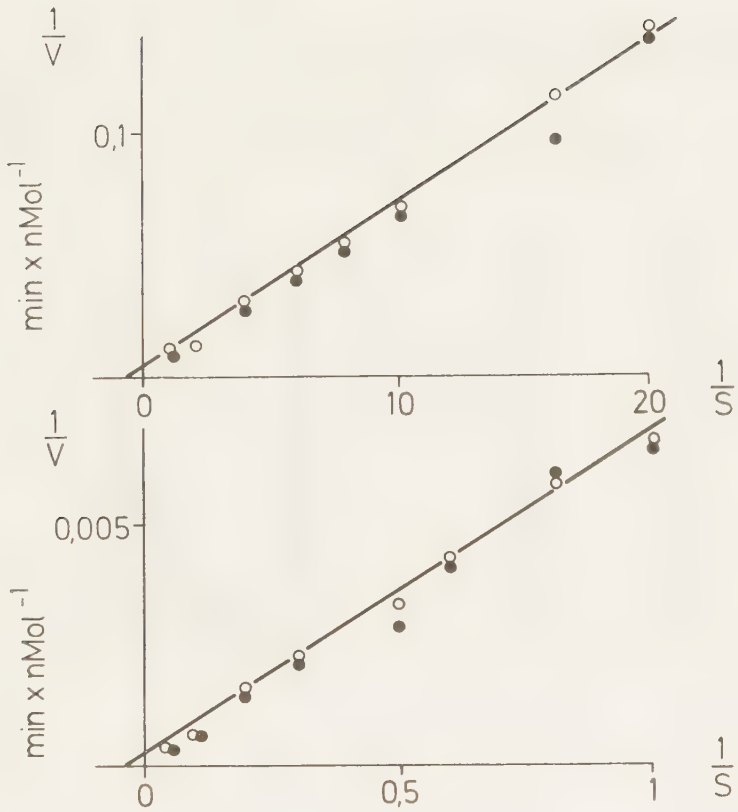


Abb. (9): Die Reziprokwerte der Substratkonzentrationen und der Umsatzgeschwindigkeit sind im Bereich von 0,05 bis 1,0 bzw. 1,0 bis 10,0  $\mu\text{Mol cAMP}$  graphisch dargestellt.

Aus den Versuchen errechnet sich eine niedrige  $K_m$  der Partikelfraktion von 20,8  $\mu\text{M}$  und eine hohe  $K_m$  von 140  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.5. Spezifische Aktivität der PDE

Die spezifische Aktivität der PDE entspricht der der gebildeten Menge Adenosin pro Minute und mg Protein, ausgedrückt in  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ . Sie wurde in allen Fraktionen bestimmt wie folgende Tabelle zeigt.

| Fraktion         | spezifische Aktivität<br>( $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) |        |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                  | 1 $\mu\text{M}$                                                                         | 0,1 mM |
| Gesamthomogenat  | 0,152                                                                                   | 13,26  |
| Überstand        | 0,069                                                                                   | 3,45   |
| Kernfraktion     | 0,030                                                                                   | 0,3    |
| Mitochondrien    | 0,007                                                                                   | 0,14   |
| leichte Mitoch.  | 0,025                                                                                   | 0,45   |
| Microsomen       | 0,021                                                                                   | 0,26   |
| Partikelfraktion | 0,148                                                                                   | 13,78  |

Tab. (7):

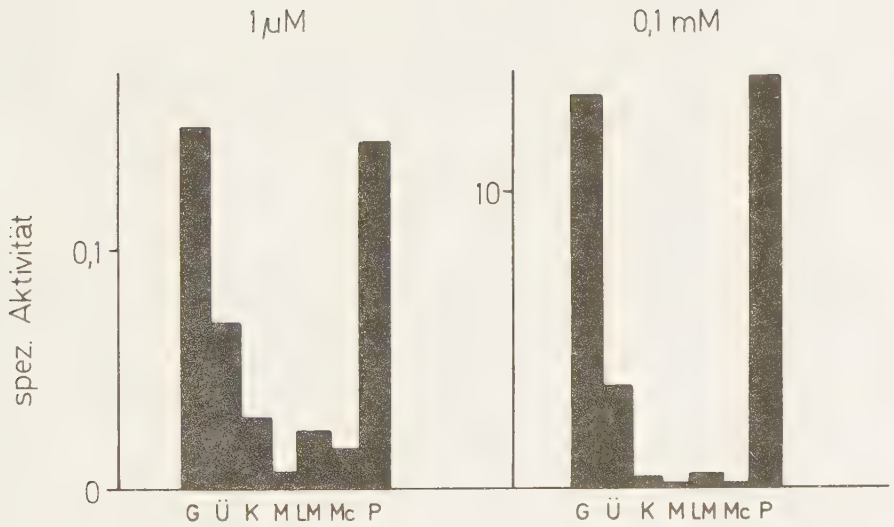


Abb. (10): Spezifische Aktivität der PDE in verschiedenen Fraktionen. (siehe Abkürzungen S. III)

## 3.2. Insulineffekte auf die Aktivität der PDE

### 3.2.1. Untersuchungen in vitro

#### 3.2.1.1. Insulineffekt in der Partikelfraktion

##### (+ Glucagon + NaF)

Die Anwesenheit von Insulin oder NaF ergab in beiden Konzentrationsbereichen eine Abnahme der PDE-Aktivität gegenüber den Basalwerten. Glucagon konnte im niedrigen  $K_m$ -Bereich im Gegensatz zum hohen die Enzymaktivität steigern. Bei kombinierter Gabe von Insulin und NaF zeigte sich im Bereich der niederen  $K_m$  eine Aktivitätssteigerung.

|               | spezifische Aktivität<br>(n Mol x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup> ) |            |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|
|               | niedere $K_m$                                                            | hohe $K_m$ |
| Basalwert     | 0,050                                                                    | 2,295      |
| Insulin       | 0,046                                                                    | 1,857      |
| NaF           | 0,048                                                                    | 1,672      |
| Glucagon      | 0,054                                                                    | 1,854      |
| Insulin + NaF | 0,071                                                                    | 2,089      |

Tab. (8): Änderung der spezifischen Aktivität in der Partikelfraktion unter der Einwirkung von Insulin, Glucagon und NaF.

### 3.2.1.2. Insulineffekt in Leberschnitten (Gesamthomogenat)

Die Zugabe verschiedener Insulinkonzentrationen zu den Leberschnitten zeigte unterschiedliche Wirkung auf die spezifische Aktivität der PDE. Klar erkennbar war eine Steigerung der spezifischen Aktivität bei Einsatz von 500  $\mu$ E Insulin. Die anderen Insulinkonzentrationen zeigten weder im niedrigen noch im hohen cAMP-Bereich einen erkennbaren Effekt. Die einzelnen Werte sind aus der Tabelle (9) zu ersehen.

|                  | K                   | 10    | 50    | 100   | 500                  | 1000                | 5000                | 10000                |
|------------------|---------------------|-------|-------|-------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| n=               | 6                   | 1     | 1     | 1     | 6                    | 2                   | 2                   | 2                    |
| 1 $\mu$ M<br>SEM | 0,167<br>$\pm$ 0,06 | 0,175 | 0,160 | 0,153 | 0,184<br>$\pm$ 0,052 | 0,172<br>$\pm$ 0,03 | 0,182<br>$\pm$ 0,02 | 0,164<br>$\pm$ 0,012 |
|                  | p<0,02              |       |       |       |                      |                     |                     |                      |
| 0,1 mM<br>SEM    | 15,20<br>$\pm$ 1,68 | 16,4  | 15,3  | 15,4  | 16,7<br>$\pm$ 0,34   | 15,4<br>$\pm$ 0,98  | 16,1<br>$\pm$ 1,41  | 14,8<br>$\pm$ 0,41   |

p<0,1

Tab. (9): Spezifische Aktivität ( $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) der PDE in Leberschnitten nach Zugabe verschiedener Insulinkonzentrationen (10 - 10 000  $\mu$ E Insulin)  
Signifikanzen bezogen auf Kontrollwert K.

### 3.2.1.3. Insulineffekt an isolierten Leberzellen

Die Vitalitätsprüfung der isolierten Leberzellen ergab bei Zusatz von Glukagon eine 20,7%ige Steigung der Glukosekonzentration. Weder im Überstand noch im Pellet der isolierten Leberzellen zeigte sich eine Änderung der spezifischen Aktivität der PDE unter Einwirkung von Insulin bzw.  $\text{Ca}^{++}$ .

|           |                         | k                      | Insulin<br>100 $\mu\text{E}$ | Insulin<br>1000 $\mu\text{E}$ | Insulin<br>100 $\mu\text{E}$ +<br>50mM $\text{Ca}^{++}$ |
|-----------|-------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|
| ÜBERSTAND | 1 $\mu\text{M}$<br>cAMP | 0,0001317<br>0,0001456 | 0,0001512<br>0,0001198       | 0,000125                      | 0,0001299                                               |
|           |                         | 0,0001616<br>0,0001890 | 0,0001707<br>0,0002024       | 0,0001591                     | 0,0001657                                               |
| PELLET    |                         |                        |                              |                               |                                                         |

Tab. (10): Spezifische Aktivität in Pellet und Überstand isolierter Leberzellen unter Zusatz von Insulin bzw.  $\text{Ca}^{++}$

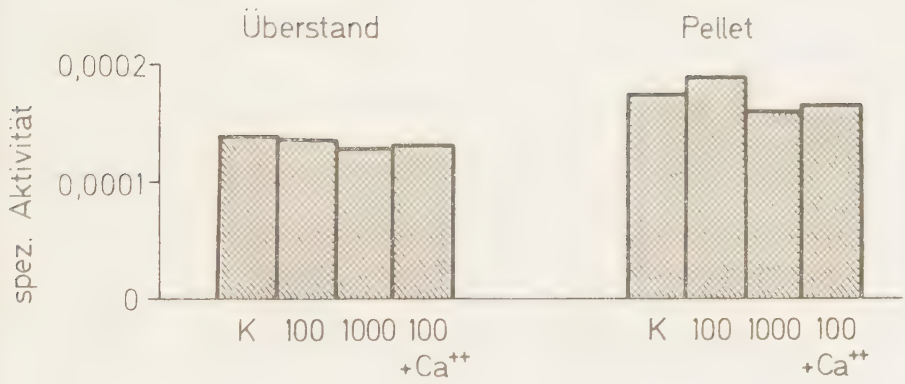


Abb. (11): Spez. Aktiv. der PDE in Überstand und Pellet isolierter Leberzellen unter Zusatz von Insulin (100 bzw. 1000  $\mu$ E) und 50 mM  $\text{Ca}^{++}$ . cAMP: 1  $\mu$ M

### 3.2.2. Untersuchungen in vivo

#### 3.2.2.1. Insulineffekt in Partikelfraktion nach Insulininfusion in die Vena portae.

Die Infusion von Insulin in die Pfortader gesunder Mäuse ergab in der Partikelfraktion der Leber einen Abfall der spezifischen Aktivität der PDE.

| cAMP      | Partikel |         |
|-----------|----------|---------|
|           | K        | Insulin |
| 1 $\mu$ M | 0,00269  | 0,00141 |
| 0,1 mM    | 0,239    | 0,1597  |

Tab. (11): Spezifische Aktivität der PDE in der Partikelfraktion nach Insulininfusion (500  $\mu$  E) in die Vena portae

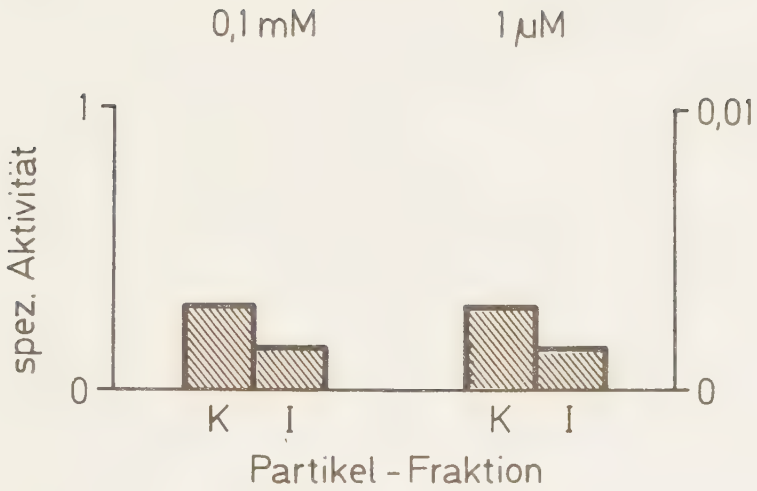


Abb. (12): Spez. Akt. der PDE in Partikelfraktion und Gesamthomogenat nach Insulininfusion ( $500 \mu\text{E}$ ) in die Vena Portae. cAMP-Konz.: 0,1 mM und  $1 \mu\text{M}$

### 3.3.3.3. Insulineffekt in Überstand und Partikelfraktion diabetischer Mäuse

Die Behandlung mit Streptozotocin bzw. Insulin wurde über die Bestimmung des Blutzuckers kontrolliert. Dabei stiegen die Werte der unbehandelten Mäuse von 121 mg% auf 510 mg% in der diabetischen Gruppe und fielen in der mit Insulin behandelten auf Normbereiche zurück.

Im Überstand lag die spezifische Aktivität der PDF der Kontrollgruppe bei  $5,4 \text{ n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  (hohe  $K_m$ ) bzw.  $0,0658 \text{ n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  (niedrige  $K_m$ ). In der Gruppe der diabetischen Mäuse stieg sie auf 6,18 (0,077)  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  und lag bei der mit Insulin behandelten Gruppe bei 6,25 (0,0716)  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ .

In der Partikelfraktion wurde eine höhere spezifische Aktivität gemessen. Sie lag in der Kontrollgruppe bei 13,78  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  (hohe  $K_m$ ) bzw. 0,148  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  (niedrige  $K_m$ ). In der diabetischen Gruppe zeigte sie ähnliche Werte mit 14,4 bzw. 0,143  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  und sank bei den mit Insulin behandelten Mäusen auf 13,0 bzw. 0,132  $\text{n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ .

|               |                    | Überstand         |                  |                   | Partikelfraktion |                 |                  |
|---------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|
| hohe $K_m$    | Gruppe             | Kontr.            | Diab.            | Insulin           | Kontr.           | Diab.           | Insulin          |
|               | n=                 | 13                | 12               | 9                 | 4                | 4               | 4                |
|               | spez. Akt. SEM     | 5,4<br>±0,44      | 6,18<br>±0,38    | 6,25<br>±0,47     | 13,78<br>±0,57   | 14,3<br>±1,27   | 13,6<br>±0,61    |
|               | rel. Verb.         | 100%              | 114,4%           | 115,7%            | 100%             | 104,5%          | 94,3%            |
| niedere $K_m$ | n=                 | 13                | 12               | 12                | 4                | 4               | 4                |
|               | spez. Akt. SEM     | 0,0658<br>±0,0042 | 0,077<br>±0,0046 | 0,0716<br>±0,0028 | 0,148<br>±0,0078 | 0,143<br>±0,011 | 0,132<br>±0,0092 |
|               | rel. Verb.         | 100%              | 117,2%           | 108,8%            | 100%             | 96,6%           | 89,2%            |
|               | Biuret Prot. mg/ml | 12,15             | 10,65            | 9,77              | 5,02             | 5,27            | 5,6              |

Tab.(12):

In der Tabelle sind die spezifischen Aktivitäten der PDE in den drei Gruppen zusammengefaßt, welche im niederen und hohen  $K_m$ -Bereich in Überstand und Partikelfraktion gemessen wurden.

#### 4. Diskussion

Im Gegensatz zur früheren Annahme, daß die Hormone direkten Einfluß auf den intrazellulären Stoffwechsel nehmen, hat Sutherland 1962 mit der Entdeckung des Adenylatzyklasesystems und des cAMP eine "indirekte" Hormonwirkung auf den intermediärstoffwechsel gezeigt (59). Hier wurde den Hormonen der Begriff des "first messengers" zugeordnet, die über einen "second messenger" - in diesem Falle das cAMP - einen spezifischen intrazellulären Vorgang auslösen. Im Falle des Insulins wird angenommen, daß es über einen hemmenden Einfluß auf das Adenylatzyklasesystem eine erniedrigte cAMP-Konzentration in der Zelle und damit eine herabgesetzte Phosphorylase- und Lipaseaktivität bewirkt. Das cAMP aktiviert inaktive Proteinkinasen, die wiederum die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, Lipolyse und Glykogenolyse aktivieren. Der cAMP-Spiegel wird neben der Adenylatzyklase von der Phosphodiesterase reguliert. In Anwesenheit von  $Mg^{++}$  wird cAMP von der Phosphodiesterase zu 5'-AMP umgebaut.

"Die Kombination von Insulin mit einem Rezeptor in einer Zielzelle ist das Herz des Problems der Hormonwirkung". Diesen Gedanken äußerte Rieser (53) 1967 in seinem Buch über Insulinwirkung, nachdem schon Stadie (57) das Vorhandensein eines Insulin-Rezeptors bewiesen hatte. Viele Studien zeigten seither, daß die Rezeptorstellen Proteine und Glycoproteine sind, die in der Lage sind, Insulin zu erkennen und zu binden (15). Die partielle Reinigung der Rezeptor-Proteine aus Plasmamembranpräparationen ist Cuatrecasas 1974 gelungen. Dennoch ist nicht klar, ob Insulin nur von außen auf die Zelle wirkt. Versuche mit Sepharose-gebundenem Insulin deuteten zunächst auf einen ausschließlichen Effekt auf den Membranrezeptor hin (5). Arbeiten von Davidson 1973 und Kolb et al. 1975 (17,40) zeigten eine gewisse Lösung des Insulins von den Sepharosemolekülen, welche eventuell auch für den beobachteten Effekt verantwortlich sein kann. Darüber hinaus fand Goldfine (22) 1976, daß Insulin auch an isolierte Zellkerne gebunden wird. Weitere Kenntnisse brachte die Markierung des

Insulins mit radioaktivem Jod, welche die biologische Aktivität nicht beeinflusste. Mit der Einführung der quantitativen vergleichenden Studien (42,23) konnte die Spezifität demonstriert werden.

Kinetische Studien über die Bindung von markiertem Hormon bedeuten zur Zeit den größten Fortschritt in der Forschung des Mechanismus der Hormon-Rezeptor-Interaktion. Die Insulinbindung ist negativ kooperativ (46), das heißt, je mehr Bindungsstellen mit Insulin besetzt sind, desto geringer wird die Bindungsaffinität der restlichen Rezeptoren. Der graphische Auftrag zeigt hier ein nicht lineares Scatchard-Plot. Die Selbstaggregation konnte durch Polyvinyl-Pyrrolidone-Insulin von Hepp et al. (32) ausgeschlossen werden.

Hyperinsulinismus und Insulinresistenz ist bei fetten, hyperglykämischen Mäusen mit einem Mangel an Insulinrezeptoren verbunden (38). Weiterhin weisen diabetische und insulinresistente adipöse Patienten in ihren Geweben eine reduzierte Insulinbildung auf (3,48). Dies bedeutet, daß der zugrundeliegende, eventuell genetisch bedingte Defekt bei Insulin-resistenten Patienten in einer reduzierten Anzahl von Insulinrezeptoren begründet liegt. Der China-Hamster gilt als das Gegenstück zum Hyperinsulinismus. Wie beim juvenilen Diabetiker (21) ist als Kompensation für einen geringen Insulinspiegel die Bindungskapazität der Lebermembranen erhöht (30). Nach Insulinbehandlung sinkt die Zahl der Rezeptoren teilweise sogar unter die Norm. Das gleiche Ergebnis brachten Untersuchungen an Streptozotocin-geschädigten Tieren, die mit Insulin behandelt wurden. Insulin scheint damit auf eine noch unbekannte Weise den Umsatz oder vielleicht nur die Verfügbarkeit der Bindungsstellen in der Plasmamembran zu kontrollieren (32). Dieses Adaptationsphänomen der Rezeptoren an die jeweilige Insulinkonzentration spricht gegen einen Rezeptormangel als primären genetischen Defekt beim Diabetes mellitus. Dagegen weisen Untersuchungen von Flier et al. (20) an Diabetikern mit Acanthosis nigricans auf eine hormonelle Genese hin: bei diesen Patienten, die eine charakteristische Insulinresistenz aufweisen, obgleich sie sehr schlank sind,

wurden Antikörper gegen die eigenen Hormonrezeptoren gefunden.

Angesichts der Zweifel an der zentralen Rolle des cAMP beim antilipolytischen Effekt des Insulins untersuchte Hepp die Insulinwirkung auf cAMP-Spiegel in Fettzellen. Dabei läßt die Gabe von Isoproterenol zu Fettzellen die cAMP-Spiegel innerhalb von 2 Min. zu einem Fließgleichgewicht ansteigen. Durch einen PDE-Hemmer (Methyl-Isobutyl-Xanthin, MIX) wird ein linearer Anstieg der cAMP-Spiegel über 5 Minuten beobachtet, auch ist die Umsatzrate von gebildetem cAMP initial verdoppelt. Falls MIX ausschließlich auf die PDE wirkt, kann man auf eine gleichzeitige Aktivierung dieses Enzyms schließen. In der Tat wird die PDE in der Fettzelle von lipolytisch wirkenden Hormonen indirekt über cAMP-Erhöhung aktiviert (49). Der lineare Anstieg der cAMP-Rate in Anwesenheit von MIX spricht gegen den Einfluß eines Feedback-Hemmers in diesem Moment, obwohl eventuell MIX selbst die Bildung eines solchen Inhibitors verhindern könnte. Propranolol führt konzentrationsabhängig zu einem neuen Fließgleichgewicht, was bei maximaler Konzentration von Insulin nicht weiter verändert werden kann. Der  $\beta$ -Blocker verhindert die hormonelle Aktivierung des Adenylatzyklasesystems in dosisabhängiger Weise und die Menge an gebildetem cAMP bestimmt die Höhe des Fließgleichgewichtes. Bisher ist noch nicht geklärt, durch welchen Mechanismus das PDE-System bei der Kontrolle des Fließgleichgewichtes einbezogen ist. Entweder durch Aktivierung der "low- $K_m$ -PDE" durch Hormone und cAMP (49,62) oder durch die Aktivität der "high- $K_m$ -PDE" bei Substratkonzentrationen innerhalb des Bereiches von Kinetiken nullter Ordnung. Insulin zusammen mit Isoproterenol (24) führt zu einem signifikanten Effekt nach einer Minute. Insulin kann den initialen Anstieg des cAMP nicht verhindern und führt wie Propranolol zu einem neuen Fließgleichgewicht. Insulin allein hat keinen Effekt auf die basalen cAMP-Spiegel. Es wirkt etwas langsamer als Propranolol, wirkt aber offensichtlich in gleicher Weise über eine Hemmung der Katecholamin-stimulierten Adenylatzyklase. Ein Effekt von Insulin in Anwesenheit eines

PDE-Hemmers würde auch den primären Angriffspunkt am Zyklase-System beweisen. Butcher et al. (12) haben das in Anwesenheit von Methyl-Xanthin an dem mit Katecholamin stimulierten System der Fettzelle nachgewiesen. Häring et al. (24) meinen, daß sowohl die Bildung als auch der Abbau von cAMP von Insulin berührt wird. Aus indirekten Experimenten, bei denen die Kinetik von cAMP in Fettzellen gemessen wird, läßt sich ableiten, wie Insulin den Effekt kataboler Hormone verhindert: Auf der einen Seite antagonisiert Insulin den Effekt von Adrenalin und Glucagon auf das Adenylatzyklasesystem, auf der anderen Seite stimuliert es die PDE-Aktivität. Hepp (27) beobachtete einen Antagonismus von Insulin an der durch Glucagon stimulierten Adenylatzyklase in einer Membranpräparation aus Mäuseleber. Insulin verhindert den Effekt von submaximalen Konzentrationen von Norepinephrin, Glucagon und ACTH an Fettgewebsmembranen (29,52). In verschiedenen Membranfraktionen von Leber- und Fettzelle beobachteten Illiano et al. (35) die gleichen Effekte. In anderen Arbeiten (4,41 19) wurden ebenfalls direkte Insulineffekte auf das Adenylatzyklasesystem gezeigt, wiederum in Antagonismus zur Wirkung der katabolen Hormone. Entgegengesetzte Ergebnisse brachten Arbeiten von Combret (13), Schönhöfer (54) und Pilgis (50). Cuatrecasas fand einen Effektverlust im Laufe der Zellpräparation (16). Offenbar sind die Effekte nur bei Verwendung von frischem Material konstant reproduzierbar (32).

Loten und Sneyd (44) beobachteten bei der Phosphodiesterase zwei Michaelis-Menten-Konstanten, wie schon von Brooker 1968 (11) im Rattenhirn und Beavo (5) 1970 am Ochsenherz beschrieben. An Fettzellen fand Loten einen Effekt von Insulin auf eine PDE mit niedriger  $K_m$  (44). Bemerkenswert dabei ist, daß die intakte Zelle vor der Präparation mit Insulin inkubiert wurde, und der direkte Kontakt von Insulin mit dem Zellhomogenat keinen klaren Effekt hatte. Diese Beobachtung wurde an mehreren Instituten gemacht (49,62,52) und war besonders deutlich in Plasmamembranen (49,33).

Allerdings stimulieren auch die Insulinantagonisten wie Katecholamine und Glucagon die PDE mit niedriger  $K_m$  (49,62),

ein Enzym, was vielleicht auch durch cAMP selbst aktiviert wird (49).

Kissebah sieht  $\text{Ca}^{++}$  in einer Schlüsselrolle im Insulinwirkungsmechanismus: unter Insulineinwirkung wird ein  $\text{Ca}^{++}$ -Anstieg im Cytosol als zentraler Mechanismus gefunden (37).  $\text{Ca}^{++}$  soll eine Lipolysehemmung nicht über cAMP-Erniedrigung bewirken (56). Das legt nahe, daß Änderungen im cAMP-Spiegel nicht essentiell für die Lipolysekontrolle sind, sondern daß  $\text{Ca}^{++}$  der second messenger ist, der die Lipase und andere Schlüsselenzyme im Sinne der Insulinwirkung beeinflusst. Hepp (32) vermutet, daß der gesamte cAMP-Gehalt nicht notwendigerweise die Änderungen in einem engen aber metabolisch aktiven Kompartement widerspiegelt und daß Schwankungen in der Adenylatzyklaseaktivität den Hormoneffekten auf die  $\text{Ca}^{++}$ -Verteilung vorausgehen.

Bei den Untersuchungen der PDE stellte sich zunächst die Frage nach ihrer Lokalisation in der Zelle. Bei der Fraktionierung der Leberzelle wurden Arbeiten von de Duve et al. (18) herangezogen, der in Abweichung von früheren Techniken die klassische Mitochondrienfraktion in zwei weitere Unterfraktionen aufteilte. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (siehe Tab. 2) fand sich der größte Teil der PDE-Enzymaktivität im Überstand (70% bzw 90%). Mit Ausnahme der Kernfraktion waren in den andere Fraktionen minimale Aktivitäten zu sehen. Die spezifische Aktivität der PDE war im Überstand um den Faktor 10 höher als in den übrigen Fraktionen. Dies legt den Schluß nahe, daß die PDE überwiegend nicht in einer speziellen Zellorganelle vorkommt, sondern im Protoplasma der Zelle vorliegt und dort ihre Wirkung entfaltet. Von der Modellvorstellung ausgehend, daß Insulin an der Zellmembran wirkt, und sich die weiteren Schritte der Wirkungskette in oder an ihr abspielen, wurde einer Praeparation von Zellmembranen besonderes Augenmerk geschenkt. In dieser Partikelfraktion wurde von Tria et al. (61) bei Einsatz von 0,1 mM cAMP eine spezifische Aktivität von  $4,47 \text{ n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ , bei  $1 \mu \text{ M}$  cAMP eine Aktivität von  $0,04 \text{ n Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  gemessen.

Dabei findet er ähnlich hohe Werte im Homogenat. Interessant dabei erscheinen die gleich hohen Aktivitäten in Partikelfraktion und Gesamthomogenat, die in der vorliegenden Arbeit bei etwa  $13 \text{ n Mol x min}^{-1} \text{ x mg}^{-1}$  liegen. (siehe Tab. 2 und 7). Dabei ist die Differenz der Werte wohl auf Unterschiede in der Praeparation der Plasmamembranen zurückzuführen. Die spezifische Aktivität in der Partikelfraktion liegt um den Faktor 3 höher als im Überstand, was ein weiteres Argument für das Modell ist, daß die PDE vornehmlich an der Plasmamembran zu finden ist. Bei den hohen Aktivitäten, die bei der Präparation nach de Duve im Überstand zu sehen sind, ist anzunehmen, daß durch die mechanische Homogenisierung die Enzymaktivität in den  $100\,000 \times g$  Überstand entlassen wurde, was auch Hepp et al. (26) beschrieben haben. Die Differenz zu den Werten der Partikelfraktion ist wahrscheinlich auf einen Aktivitätsverlust durch die Zellpräparation selbst zu erklären, wie sie auch von Beavo, Sutherland et al. (6) beschrieben wurde. Für die Rattenleber haben diese Autoren in einer ähnlichen Zellfraktionierung ebenfalls die höchsten Werte der spezifischen Aktivität der PDE im Homogenat und im Überstand gefunden, wobei die Aktivitäten im Überstand durchweg unter denen des Homogenates lagen. Sowohl die hohe wie die niedrige  $K_m$ -PDE kommen in allen Fraktionen in ähnlicher Verteilung vor. Die niedrige  $K_m$ -PDE zeigt in der Fraktion der Kerne und der leichten Mitochondrien eine relativ höhere Aktivität als die hohe  $K_m$ -PDE. Hepp et al. (26) finden eine spezifische Aktivität der PDE in der Membranfraktion der Fettzelle von 15,3, im Überstand von 6,1 und im Homogenat von 4,3  $\text{n Mol x min}^{-1} \text{ x mg}^{-1}$ . Dabei korreliert der Wert aus der Membranfraktion gut mit den hier gefundenen Ergebnissen aus der Partikelfraktion. Andere Autoren (50,1,61) diskutieren für die spezifische Aktivität der hohen  $K_m$ -PDE in der Rattenleber zwischen 0,5 und 4,0 und für die niedrige  $K_m$ -PDE 0,045 bis 0,16  $\text{n Mol x min}^{-1} \text{ x mg}^{-1}$ . Menahan et al. (45) finden im Überstand der Rattenleber 13,8 und im Homogenat 6,3  $\text{n Mol x min}^{-1} \text{ x mg}^{-1}$ , was auch wieder der hohen  $K_m$  entspricht. Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung (siehe Abb. 3) bei

den beiden Substratkonzentrationen weist - wie auch die beiden Michaelis-Menten-Konstanten - auf zwei verschiedene Enzymaktivitäten hin.

Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten  $K_m$  der PDE im Überstand fiel bei der graphischen Darstellung nach Lineweaver und Burk eine Funktion mit zwei Steigungsbereichen und einem Schnittpunkt bei  $1,0 \mu\text{Mol cAMP}$  auf. Bei der getrennten Untersuchung dieser beiden Bereiche ergaben sich zwei verschiedene Michaelis-Menten-Konstanten von  $0,72$  bis  $1,66 \mu\text{Mol}$  für die niedrige und  $31 - 40 \mu\text{M}$  für die hohe  $K_m$ -PDE. Für die Partikelfraktion wurden  $20,8 \mu\text{M}$  für die niedrige  $K_m$  und  $140 \mu\text{M}$  für die hohe  $K_m$  berechnet. Das Vorliegen zweier Michaelis-Menten-Konstanten wird von mehreren Autoren in verschiedenen Geweben und Fraktionen gefunden. Loten und Sneyd (44) geben in der Fettzelle für die niedrige  $K_m$   $0,88 \mu\text{M}$  an, für die hohe  $41 \mu\text{M}$ . Beavo, Sutherland (5) finden in Rinderherzen entsprechend  $0,8 \mu\text{M}$  und  $25 \mu\text{M}$ , in der Rattenleber  $28 \mu\text{M}$ . Ebenso beschreiben Blecher et al. (9) in der Fettzelle eine  $K_m$  von  $23,5 \mu\text{M}$ , die nach der gewählten Substratkonzentration wohl einer hohen  $K_m$  entsprechen dürfte; gleiches gilt für die Arbeiten von Menahan, Hepp (45) mit einem Wert von  $63 \mu\text{M}$ . Thompson et al. (60) weisen im Homogenat der Rattenleber eine niedrige  $K_m$  von  $6,7 \mu\text{M}$  und eine hohe  $K_m$  von  $130 \mu\text{M}$  nach, was den Werten der vorliegenden Arbeit in der Partikelfraktion näher käme. In den Plasmamembranen der Fettzelle geben Tria et al. (61) für die niedrige  $K_m$   $1,22 \mu\text{M}$  und für die hohe  $K_m$   $161,7 \mu\text{M}$  an. Pilgis et al. (50) finden in den Plasmamembranen entsprechend  $0,5 \mu\text{M}$  und  $70 \mu\text{M}$ . Es ist die Tendenz zu erkennen, daß von den eben erwähnten Autoren in der Partikelfraktion durchwegs höhere Werte, insbesondere der hohen  $K_m$ -PDE gefunden werden als in Homogenat und Überstand. Die beiden  $K_m$ -Werte werden als zwei verschiedene Enzyme diskutiert oder als unübliches kinetisches Verhalten eines Enzyms, was Levitski und Koshland (43) beobachtet und "negativ-kooperatives" Enzym genannt haben. Die Entscheidung über die Richtigkeit dieser beiden Thesen wird wohl erst die Reindarstellung des Enzyms bringen. In der Partikelfraktion zeigt die Zugabe von Insulin allein keinen signifikanten Effekt auf die spezifische Aktivität der

PDE beider Konzentrationsbereiche. Es werden lediglich geringgradige Aktivitätsverluste von 10 - 20% gemessen. Im Gegensatz dazu berichten House et al. (34) über eine in vitro-Stimulation der PDE durch Insulin in der Plasmamembranfraktion bis zu 40%. In gleicher Weise sehen Tria et al. (61) eine Aktivitätssteigerung beider  $K_m$ -Bereiche. Auch Pilkis et al. (50) beschreiben eine 47%ige Stimulierung der spezifischen Aktivität der niedrigen  $K_m$ -PDE durch Insulin, in vitro sieht er dagegen keinen Effekt.

Im Gesamthomogenat wird bei Einsatz von 500  $\mu$ E Insulin eine leichte Erhöhung der Aktivität beider  $K_m$ -Bereiche um ca. 10% gefunden. Ähnlich berichten Senft et al. (55) über einen Insulineffekt an Homogenaten von Rinderherzen. Mehrere andere Autoren (26,45,9,61,60) dagegen vermissen eine Insulinwirkung auf die PDE im Homogenat. Loten (44) sieht ebenfalls keinen Effekt auf das Homogenat, beschreibt aber bei Insulinzugabe zu intakten Fettzellen eine Erhöhung in der niedrigen und eine Senkung in der hohen  $K_m$  der PDE Aktivität. Senft (55) publizierte einen in-vivo Effekt nach Insulin- oder Glucoseinjektion, der in Leber, Fettzelle und geringer auch in der Muskulatur als rascher PDE-Aktivitätsanstieg messbar ist. An isolierten Leberzellen ist ebenfalls keine Stimulation durch Insulin verschiedenster Konzentrationen und Zusatz von 50 mM  $Ca^{++}$  feststellbar, was Hepp et al. (26) an der Fettzelle schon beschrieben haben und Tria et al. (61) an der Rattenleber bestätigen.

Die in vivo Untersuchungen in der Partikelfraktion lassen einen deutlichen Abfall der Aktivität in beiden  $K_m$ -Bereichen erkennen, was den eigenen Ergebnissen der in vitro-Versuche entspricht.

Im Überstand diabetischer Mäuse liegt die spezifische Aktivität der PDE um ca. 15% über den Kontrollwerten. In der Partikelfraktion diabetischer Mäuse war insgesamt keine Änderung der spezifischen Aktivität zu erkennen. Auf Grund dieser Beobachtung kann man schließen, daß ein Hypoinsulinismus (z.B. Diabetes mellitus) die spezifische Aktivität der PDE nicht beeinflusst. Auch Blecher et al. (9) berichten von der Fettzelle, daß weder Hyper- noch Hypoinsulinismus einen Effekt

auf die PDE hat. Müller-Oerlinghausen (47) sieht ebenfalls beim Diabetes mellitus keine Beeinflussung der PDE. Senft (55) und Pilkis (50) dagegen beschreiben einen Aktivitätsverlust der PDE in Fett- und Leberzelle der Ratten.

Die Behandlung der diabetischen Mäuse mit Insulin zeitigt unterschiedliche Wirkungen auf die PDE. Im Überstand läßt sich eine geringe Erhöhung, in der Partikelfraktion eine ebenso geringe Senkung der PDE-Aktivität ersehen.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeiten kann gelten, daß Insulin keinen direkten Effekt auf die verschiedenen Zellfraktionen der Mäuseleber hat, was mit den Daten der meisten Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Geweben und Tieren übereinstimmt (siehe Anhang). Der einzige Hinweis auf eine Insulinwirkung auf die Phosphodiesterase des cAMP ist der signifikante Anstieg der PDE-Aktivität nach Zusatz von 500  $\mu$ E Insulin auf Leberschnitten in Anwesenheit von 0,1 m Mol und 1  $\mu$ M cAMP. Einen entsprechenden Effekt sahen Loten und Sneyd bei der Fettzelle, allerdings nur auf die niedrige  $K_m$ . Tria et al. (61) beschreiben auch einen indirekten Effekt in vitro auf die niedrige wie auch die hohe  $K_m$ .

Da die einzige Insulinwirkung auf die PDE-Aktivität an der intakten Zelle von Leberschnitten gefunden wurde, bleibt offen, welcher Wirkungsmechanismus diesem indirekten Effekt zugrunde liegt.

## 5. Zusammenfassung

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung der cAMP-Phosphodiesterase zeigt die Hauptaktivität des Enzyms im 100 000 x g Überstand, was nicht ausschließt, daß die Phosphodiesterase in der intakten Zelle vorwiegend an der Plasmamembran zu finden ist. Eigene Ergebnisse über die Höhe der spezifischen Aktivität in der Partikelfraktion machen dies ebenso wahrscheinlich.

Die unterschiedliche Verteilung der "low bzw. high"  $K_m$ -PDE ist ein weiterer Hinweis auf das tatsächliche Vorliegen zweier Enzymaktivitäten bzw. Enzyme.

Wie schon bei anderen Autoren ergeben sich auch bei der vorliegenden Untersuchung zwei Michaelis-Menten-Konstanten der Phosphodiesterase von 0,8 bis 1,66 und 31 - 40  $\mu M$  im Überstand. In der Partikelfraktion liegen die gefundenen Werte bei 25 bzw. 140  $\mu M$ .

Bestimmungen der spezifischen Aktivität in der Partikelfraktion weisen auf die Hauptlokalisation der Phosphodiesterase an der Plasmamembran hin.

Bei den in vitro-Untersuchungen an Leberzellfraktionen ist keine Insulinwirkung auf die Phosphodiesterase zu erkennen. Ein geringer aber signifikanter Effekt ist nur bei der Vorbehandlung von Leberschnitten mit 500  $\mu E$  Insulin zu sehen. Dagegen ist die Insulinbehandlung von gesunden oder diabetischen Mäusen nicht mit einem Effekt auf die Phosphodiesterase verbunden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß Insulin direkt über eine Phosphodiesterase-Aktivierung auf die Leberzelle wirkt.

# 6. Anhang

Angaben über die PDE-Aktivität und ihre hormonelle Steuerung in der bisherigen Literatur

| Autor                        | Gewebe u. Fraktion                                           | $K_m$              |         | spez. Aktivität<br>$\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ | Insulinwirkung<br>auf PDE                                                                                                                                                       |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              |                                                              | hoch               | niedrig |                                                                               |                                                                                                                                                                                 |
| Senft<br>et al<br>(55) 1968  | Ratte,<br>Leber,<br>Fett,<br>Skelett,<br>Niere,<br>Homogenat |                    |         | 3,0<br>80,6 (pro g w.w.)<br>6,37                                              | in Rinderherz in<br>vitro durch Insulin<br>erhöht<br>bei Insulinmangel<br>sinkt PDE<br>Insulin in-vivo be-<br>dingt raschen An-<br>stieg<br>in Niere: kein Ein-<br>fluß auf PDE |
| Blecher<br>et al<br>(9) 1968 | Ratte<br>Fettzelle<br>Überstand                              | 23,5 $\mu\text{M}$ |         | 0,37                                                                          | in vitro weder di-<br>rekter noch indi-<br>rekter Effekt<br>weder Hypo- noch<br>Hyperinsulinismus<br>beeinflußt Akt. der<br>PDE                                                 |

| Autor                                | Gewebe u. Fraktion                                                     | $K_m$            | spezif. Aktivität<br>$\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ | Insulinwirkung<br>auf PDE                                                           |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Müller-Oerlinghausen et al (47) 1968 | Ratte<br>Leber<br>Fettzelle<br>Homogenat                               |                  | 21,1 (pro $\text{mg N}_2$ )<br>17,1 (pro $\text{mg N}_2$ )                      | bei Diabetes keine<br>PDE-Senkung<br>Gehungerte Ratten<br>leichte PDE-Erhö-<br>hung |
| Hepp and Menahan (26) 1969           | Ratte<br>isolierte<br>Fettzelle<br>Homogenat<br>überstand<br>Membranen | 0,5 mM           | 4,3<br>6,1<br>15,3                                                              | kein Effekt nach<br>Vorinkubation im<br>Fettzellhomogenat                           |
| Menahan und Hepp (45) 1969           | Ratte<br>Leber<br>Homogenat<br>überstand                               | 62 $\mu\text{M}$ | 6,3<br>13,8                                                                     | kein Effekt bei<br>Vorbehandlung oder<br>Perfusion                                  |

| Autor                                             | Gewebe u.<br>Fraktion                             | $K_m$<br>hoch<br>niedrig                   | spezif. Aktivität<br>$\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$              | Insulinwirkung<br>auf PDE                                                                                       |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Løten and<br>Sneyd (44)<br>1970                   | Ratte<br>Homogenat<br>isolierter<br>Fettzellen    | 29 $\mu\text{M}$<br><br>0,88 $\mu\text{M}$ | ca. 4,6 (pro g dry wt.)                                                                      | kein Effekt direkt<br>zum Homogenat<br>Insulin hebt $V_{\text{max}}$<br>der niedrigen $K_m$<br>senkt hohe $K_m$ |
| Beavo, Hard-<br>man and<br>Sutherland<br>(5) 1970 | Rind<br>Herz<br>Partikel-<br>fraktion             | 25 $\mu\text{M}$<br><br>0,8 $\mu\text{M}$  | ca. 0,02 (niedrige) $K_m$                                                                    |                                                                                                                 |
| House, Poulis<br>and Weidemann<br>(34) 1972       | Ratte<br>Leber<br>Plasma-<br>membran<br>Homogenat |                                            | $0,005 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$<br><br>$0,07 \mu\text{mol}$ | direkte in vitro<br>Stimulat. um 40 %<br>bei 10 - 1600 ng/<br>ml Insulin                                        |
| Thompson,<br>Little and<br>Williams<br>(60) 1973  | Ratte<br>Leber<br>Homogenat                       | 130 $\mu\text{M}$<br><br>6,7 $\mu\text{M}$ |                                                                                              | in vitro kein<br>Effekt                                                                                         |

| Autor                          | Gewebe u.<br>Fraktion                                           | $K_m$             |                   | spezif. Aktivität<br>$\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ | Insulinwirkung<br>auf PDE                                                                                                                                 |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                |                                                                 | hoch              | niedrig           |                                                                                 |                                                                                                                                                           |
| Pilkis et al<br>(50) 1974      | Ratte<br>Leber<br>Plasma-<br>membran                            | $70 \mu\text{M}$  | $0,5 \mu\text{M}$ | $0,048$ niedrige $K_m$<br>$0,37$ hohe $K_m$                                     | niedrige $K_m$ sinkt<br>bei diab. Ratten<br>in vivo<br>steigt bei Insulin-<br>beh. in vivo um 47%<br>bei diab. Ratten<br>sinkt hohe und<br>niedrige $K_m$ |
| Allan and<br>Sneyd (1)<br>1975 | Ratte<br>isolierte<br>Leberzelle<br>Homogenat                   |                   | $0,5 \mu\text{M}$ | $0,045$ niedrig<br>$2,5$ hoch<br>idem                                           | Glucagon stimuliert<br>niedrige aber nicht<br>hohe $K_m$                                                                                                  |
| Tria et al<br>(61) 1976        | Ratte--<br>isolierte<br>Leberzelle<br>Homogenat<br>Plasmamembr. | $161,7 \text{ M}$ | $1,22 \text{ M}$  | $4,0$ hohe $K_m$<br>$0,04 - 0,1$ niedr. $K_m$<br>idem                           | im Homogenat kein<br>Effekt<br><br>direkter Effekt in<br>vitro bei niedriger<br>und hoher $K_m$                                                           |

| Autor                        | Gewebe u. Fraktion                                  | K <sub>m</sub>   |                                      | spezif. Aktivität<br>nMol x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup> | Insulinwirkung<br>auf PDE                            |
|------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| eigene<br>Ergebnisse<br>1980 | Maus<br>Leber<br>Überstand<br>Partikel-<br>fraktion | hoch<br>31-40 μM | niedrig<br>0,72-1,66 μM<br>20 -25 μM | hoch: 3,45<br>niedrig: 0,069<br>hoch: 13,78<br>niedrig: 0,148    | bei 500 E Insulin<br>in vitro indirek-<br>ter Effekt |

7. Literaturverzeichnis

- 1      Allan, E.H. and Sneyd, J.G.T.  
An Effect of Glucagon on 3':5'-Cyclic AMP Phosphodiesterase Activity in Isolated Rat Hepatocytes  
Biochemical and Biophys. Research Com. Vol 62 Nr. 3  
(1975) S. 694
- 2      Appleman, M.M. and Terasaky, W.L.: Regulation of  
cyclic nucleotide phosphodiesterase  
Advanc. in cyclic nucl. Res. 5, 153 (1975)
- 3      Archer, J.A., Gorden, P., Roth, J.: Defect in insulin  
binding to receptors in obese man. Amelioration with  
caloric restriction. J. Clin. Invest. 55, 166 - 174  
(1975)
- 4      De Asua, L.J., Surian, E.S., Flawia, M.M., Torres,  
H.N.: Effect of insulin on the growth pattern and  
adenylate cyclase activity of BHK fibroblasts.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1388 - 1392 (1973)
- 5      Beavo, J.H., Hardman, J.G. and Sutherland, E.W.  
Hydrolysis of Cyclic Guanosine and Adenosine 3':5'-  
Monophosphates by Rat and Bovine Tissues  
The Journal of Biological Chemistry Vol 245 Nr. 21  
(1970) S. 5649
- 6      Beavo, J.A., Hardman, J.G., and Sutherland, E.W.  
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. (1970) 29,  
2077
- 7      Bergmeyer, H.U., Berut, E., Schmidt, F., and Stark,  
H.: D-Glucose in: Methoden der enzymatischen Analyse  
Ed.: H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.  
S. 1163 (1970)
- 8      Birnbaumer, L., Pohl, S.L., and Rodbell, M.  
J. biol. chem. (1969) 244, 3468

- 9     Blecher, M., Merlino, N.S. and Ro-Aue, J.T.  
Control of the Metabolism and Lipolytic Effects of  
Cyclic 3':5'-Adenosine Monophosphate in Adipose  
Tissue by Insulin Methylxanthines and Nicotinic Acid  
Journal of Biological Chemistry Vol. 243 Nr. 14  
(1968) S. 3973
- 10    Bode, Ch., Goebell, H. und Stäblier, E.  
Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei Eiweiß-  
bestimmung mit der Biuret-Methode.  
Z. Klin. Chemie und Klin. Biochemie 6. Jahrg. 1968  
Heft 5
- 11    Brooker, G., Thomas, L., and Appleman, M.M.  
Biochemistry, Easton (1968) 7, 4177
- 12    Butcher, R.W., Baird, C.E., Sutherland, E.W.: Effect  
of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine  
3':5'-monophosphate levels in isolated fat cells.  
J. Biol. Chem. 243, 1705 - 1712 (1968)
- 13    Combret, Y., Laudat, P.: Adenyl cyclase activity in  
a plasma membrane fraction purified from "ghosts" of  
rat fat cells. FEBS Lett. 21, 45 - 48 (1972)
- 14    Cuatrecasas, P.: Interaction of insulin with the cell  
membrane: The primary action of insulin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 450 - 457 (1969)
- 15    Cuatrecasas, P.: Membrane receptors.  
Annu. Ref. Biochem. 43, 169 -214 (1974)
- 16    Cuatrecasas, P.: Hormone receptors - their function  
in cell membranes and some problems related to  
methodology.  
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 79 - 104 (1975)
- 17    Davidson, M.B., Van Herle, A.J., Gerschenson, L.E.:  
Insulin and sepharose-insulin effects on tyrosine  
transaminase levels in cultured rat liver cells.  
Endocrinology 92, 1442 - 1446 (1973)

- 18 De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux R., Appelmans, F.: Tissue fractionation studies. 6. intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604 - 617 (1955)
- 19 Flawia, M. M., Torres, H. N.: Adenylate cyclase activity in *neurospora crassa*. III. Modulation by glucagon and insulin, *J. Biol. Chem.* 248, 4517 - 4520 (1973)
- 20 Flier, J. S., Kahn, C. R., Roth, J., Bar, R. S.: Antibodies that impair insulin receptor binding in an unusual diabetic syndrome with severe insulin resistance. *Science* 190, 63 - 65 (1975)
- 21 Gerritsen, G. C., Dulin, W. E.: Characterization of diabetes in the Chinese hamster. *Diabetologia* 3, 74 - 84 (1967)
- 22 Goldfine, I. D., Smith, G. J.: Binding of insulin to isolated nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1427 - 1431 (1976)
- 23 Goodfriend, T., Lin, S.-Y.: Angiotensin receptors. *Clin. Res.* 17, 243 (1969)
- 24 Häring, H. U., Renner, R., Hepp, K. D.: Hormonal control of cyclic AMP turnover in isolated fat cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 5, 295 - 302 (1976)
- 25 Häring, H. U., Kemmler, W., Renner, R. and Hepp, K. D.: Initial lag-phase in the action of insulin on glucose transport and cAMP levels in fat cells. *FEBS Lett.* Vol. 95, 177 (1978)
- 26 Hepp, K. D., Menahan, L. A., Wieland, D. and Williams, R. H. I. Studies on the Action of Insulin in Isolated Adipose Tissue Cells II. 3':5'- Nucleotide Phosphodiesterase and Antilipolysis. *Biochemica et Biophysica Acta* 184 (1969) S. 554
- 27 Hepp, K. D.: Inhibition of glucagon-stimulated adenyl cyclase by insulin. *FEBS Lett.* 12, 263 - 266 (1971)

- 28 Hepp, K. D.  
Hormonwirkung an der Adenylatzyklase der Leber  
Habilitationsschrift Universität München 1972
- 29 Hepp, K. D., Renner, R.: Insulin action on the  
adenylate cyclase system: antagonism to activation  
by lipolytic hormones. FEBS Lett. 20, 191 - 194 (1972)
- 30 Hepp, K. D., Langley, J., von Funcke, H. J., Renner,  
R., Kemmler, W.: Increased insulin binding capacity  
of liver membranes from diabetic Chinese hamsters.  
Nature 258, 154 (1975)
- 31 Hepp, K. D., Renner, R., Häring, H. U.: Cyclic AMP  
and the control of lipolysis in fat cells of the rat.  
Eukariotic cell function and growth 1976, Edit.:  
Dumont, Brown and Marshall
- 32 Hepp, K. D.: Studies on the Mechanism of Insulin  
Action Basic Concepts and Clinical Implications  
Diabetologia 13, 177 - 186 (1977)
- 33 Hollenberg, C. H.: Hormonal effects on cyclic nucleo-  
tide phosphodiesterase in adipose tissue. V. Int.  
Congr. Endocrinology, Hamburg, July 18 - 24, 1976
- 34 House, P. D. R., Poulis, P. and Weidemann, M. J.  
Isolation of a Plasma- Membrane Subfraction from  
Rat Liver Containing an Insulin-Sensitive Cyclic-  
AMP Phosphodiesterase  
Eur. J. Biochem. 24 (1972) S. 429
- 35 Illiano, G., Cuatrecasas, P.: Modulation of adenylate  
cyclase activity in liver and fat cell Membranes by  
insulin. Science 175, 906 - 908, (1972)
- 36 Jungas, R. L., 1966 Proc. Natn. Acad. Sci.  
USA 56, 757
- 37 Kissebah, A. H., Hope-Gill, H., Vydellingum, N.,  
Tulloch, B. R., Clarke, P. V., Fraser, T. R.: Mode  
of insulin action.  
Lancet 1975 I, 144 - 147

- 38 Kahn, C. R., Neville, D. M., Roth, J.:  
Insulin-receptor interaction in the abese-hypergly-  
cemic mouse.  
J. Biol. Chem. 248, 244 - 250 (1973)
- 39 Kemmler, W., Renner, R., von Funcke, H. J., Hepp, K.D.:  
Increased capacity of insulin receptors in plasma  
membranes from insulin deficient rodents: reversal by  
insulin therapy (Abstr.). IX. Congress of the Int.  
Diabetes Fed., p. 160, Amsterdam: Excerpta Medica  
Congress Series 1976
- 40 Kolb, H. J., Renner, R., Hepp, K. D., Weiss, L.,  
Wieland, O. H.: Re-evaluation of sepharose-insulin  
as a tool for the study of insulin action.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 248 - 252 (1975)
- 41 Kuo, W. N., Hodgkins, D. S., Kuo, J. F.: Adenylate  
cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets  
and regulation of adenylate cyclase activity by  
various hormones and agents. J. Biol. Chem. 248,  
2705 - 2711 (1973)
- 42 Lefkowitz, R. J., Roth, J., Pricer, W.: ACTH receptors  
in the adrenal: specific binding of ACTH-<sup>125</sup>I and  
its relations to adenyl cyclase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 745 - 752 (1970)
- 43 Levitski, A., and Koshland, D. E.  
Proc. natn. Acad. Sci. USA (1969) 62, 1121
- 44 Loten, E. G. and Sneyd, J. G. T. An Effect of Insulin  
on Adipose-Tissue Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate  
Phosphodiesterase  
Biochem. J. 120 (1970) S. 187
- 45 Menahan, L. A., Hepp, K. D. and Wieland, O.  
Liver 3':5'-Nucleotide Phosphodiesterase and its  
Aktivity in Rat Livers Perfused with Insulin  
European J. Biochem. 8 (1969) S. 435

- 46 De Meyts, P.: Cooperative properties of hormone receptors in cell membranes, J. Supramol. Struct. 4, 241 - 258 (1976)
- 47 Müller-Oerlinghausen, B., Schwabe, U., Hasselblatt, A. and Schmidt, F. H. Activity of 3':5'-AMP Phosphodiesterase in Liver and Adipose Tissue of Normal and Diabetic Rats. Life Sciences Vo. 7 Part II (1968) S. 593
- 48 Olefsky, J. M., Reaven, G. M.: Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetic subjects. J. Clin. Invest. 54, 1323 - 1328 (1974)
- 49 Pawlson, I. G., Lovell-Smith, C. J., Manganiello, V. C., Vaughan, M.: Effects of epinephrine, adrenocorticotrophic hormone, and theophylline on adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1639 - 1642 (1974)
- 50 Pilakis, S. J., Exton, J. H., Johnson, R. A. and Parker, C. R. Cyclic AMP and Carbohydrate, Metabolism in Livers from Diabetic Rats. Biochimica et Bioph. Acta 343 (1974) S. 250
- 51 Ray, T. K. Biochim. Biophys. Acta 196, 1 - 9 1970
- 52 Renner, R., Kemmler, W., Hepp, K. D.: Antagonism of insulin and lipolytic hormones in the control of adenylate-cyclase activity in fat cells, Eur. J. Biochem. 49, 129 - 141 (1974)
- 53 Rieser, P.: Insulin, membranes and metabolism. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 1967
- 54 Schönhöfer, P. S., Skides: measurement by radio-immuneassay of cyclic AMP. Biochim. Biophys. Acta 304, 541 - 551 (1973)

- 55 Senft, G., Schultz, G., Munske, K. and Hoffmann, M.  
Influence of Insulin and Cyclic 3':5'-AMP Phospho-  
diesterase Activity in Liver, Skeletal, Muscle,  
Adipose Tissue and Kidney  
*Diabetologica* 4 (1968) S. 322
- 56 Siddle, K., Hales, D. N.: The action of local  
anaesthetics on lipolysis and adenosine 3':5'-cyclic  
monophosphate content in isolated rat fat cells.  
*Biochem. J.* 142, 345 - 351 (1974)
- 57 Stadie, W. C., Hargaard, N., Hills, A. G., Marsh,  
J. B.: The chemical combination of insulin with  
muscle (diaphragm) of normal rat. *Am. J. Med. Sci.*  
218, 265 - 274 (1949)
- 58 Sutherland, E. W., Rall, T. W.: Fraktionation and  
characterization of a cyclic adenine ribonucleotide  
formed by tissue particles  
*J. Biol. Chem.* 232, 1077 (1958)
- 59 Sutherland, E. W., Rall, T. W.: The relation of  
adenosine-3':5'-phosphate and phosphorylase to the  
actions of catecholamines and other hormones.  
*Pharmacol. Rev.* 12, 265 (1960)
- 60 Thompson, W. J., Little, S. A., Williams, R. H.:  
Effect of insulin and growth hormone on rat liver  
cyclic nucleotide phosphodiesterase.  
*Biochemistry* Vol. 12 No. 10, 1889 (1973)
- 61 Tria, E., Scapin, S., Cocco, C. and Luly, P.,  
Insulin-Sensitive Adenosin 3':5'-Cyclic Monophosphate  
Phosphodiesterase of Hepatocyte Plasma Membrane  
*Biochimica et Biophysica Acta* 496 (1976) S. 77
- 62 Zinman, B., Hollenberg, C. H.: Effect of insulin and  
lipolytic agents on rat adipocyte low  $K_m$  cyclic  
adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase.  
*J. Biol. Chem.* 249, 2182 - 2187 (1974)

8. Lebenslauf

Geboren am 7. Januar 1948 In Freiburg als Sohn des Arztes Dr. Karl Schroff und der Lehrerin Johanna Schroff, geb. Kuhmann. Absolvent des humanistischen Berthold-Gymnasiums in Freiburg 1967. Studium der Medizin in Freiburg und München. Staatsexamen in München Dezember 1973.  
Seit 1972 verheiratet, 4 Kinder.

- 1974 - 75      Medizinalassistent: Innere Medizin  
Krankenhaus München-Schwabing (Prof. H. Mehnert)  
6 Monate, 3 bzw. 4 Monate Radiologie und  
Chirurgie an Münchener Kliniken.
- 1975 - 76      Chirurgischer Assistenzarzt im Kreiskranken-  
haus Indersdorf
- 1976 - 80      Assistenzarzt in der Frauenklinik Dr. Geisenhofer  
München
- Seit Juli      Assistenzarzt in der Frauenklinik vom Roten  
1980          Kreuz, München (Prof. P. Bailer)







